

Department Pferde der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
Direktor: Prof. Dr. med. vet. Jörg A. Auer, MS, Dipl. ACVS/ECVS

Musculoskeletal Research Unit (MSRU)
Leiterin: Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Dipl. ECVS

In vivo Studie über die osteostimulierende Wirkung von PTH₁₋₃₄ bei
lokaler Abgabe aus einem Fibrinhydrogel

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Vetsuisse Fakultät
Universität Zürich

vorgelegt von
Dinah Streifeneder
Tierärztin
aus
München (Deutschland)

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Referentin
Prof. Dr. med. vet. Mark Flückiger, Korreferent

Zürich 2008

Per la mia Mamouna

Zusammenfassung	1
Summary	2
1 Einleitung	4
1.1 Problemstellung.....	4
1.2 Zielsetzung der Arbeit	5
2 Literaturübersicht.....	6
2.1 Das Schaf als Versuchstier zur Studie von Knochenersatzmaterialien	6
2.2 Knochenersatzmaterialien.....	7
2.2.1 Anforderungen an Knochenersatzmaterialien.....	7
2.2.2 Einteilung der Knochenersatzmaterialien	8
2.2.3 Autologe Knochenspongiosa.....	9
2.3 Wachstumsfaktoren	10
2.4 Parathormon.....	11
3 Material und Methoden	13
3.1 Knochenersatzmaterial	13
3.2 Aufbau der Studie.....	13
3.3 Vorbereitung	14
3.4 Operation	16
3.5 Probenaufbereitung und Probenauswertung	19
3.5.1 Gewinnung und Aufbereitung der Proben	19
3.5.2 Untersuchungsmethoden.....	21
3.5.3 Probenauswertung	21
3.5.4 Statistische Untersuchung.....	23
4 Ergebnisse.....	24
4.1 Operation	24
4.2 Postoperative Phase.....	24
4.3 Radiologie.....	25
4.3.1 Radiologische Auswertung	25
4.4 Histologische Auswertung.....	30
4.4.1 Histomorphometrische Auswertung	30
4.4.2 Histologische Auswertung	31
5 Diskussion	35
5.1 Ziel der Studie	35
5.2 Versuchsmodell.....	35
5.3 Chirurgisches Vorgehen	35
5.4 Probenaufbereitung und Auswertung	36
5.5 Radiologische Auswertung.....	36
5.6 Histomorphometrische Auswertung.....	37
5.7 Histologische Auswertung.....	39
5.8 Gesamturteil.....	41
5.9 Perspektiven.....	41
6 Literaturverzeichnis	42

7	Abkürzungsverzeichnis	47
8	Anhang	48
8.1	Tabellen	48
8.2	Abbildungen.....	52
	Danksagung	56
	Lebenslauf	

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte die osteostimulierende Wirkung von PTH₁₋₃₄, bei lokaler Abgabe aus einem Fibrinhydrogel, in einem segmentalen diaphysären Defekt in einer tierexperimentellen Studie an Schafen untersucht werden. Die geeignete Konzentration sollte durch den Vergleich von bioaktivem PTH₁₋₃₄ mit der alleinigen Defektfüllung mit Fibrinhydrogel (Fibrin), mit Leerdefekten (Empty) und mit autologer Knochenspongiosa (Autograft) gefunden werden. Hierfür wurden 28 Schafe in 5 Gruppen {Empty (n=5), Fibrin (n=6), PTH_{low} (n=6), PTH_{high} (n=6), Autograft (n=5)} unterteilt. Die Defektfüllung der Gruppe PTH_{low} enthielt zusätzlich zum Fibrinhydrogel eine geringe PTH₁₋₃₄-Konzentration, die der Gruppe PTH_{high} eine geringgradig höhere PTH₁₋₃₄-Konzentration. Als Defekt wurde die Osteotomie eines standardisierten „full size defect“ von 1 Zentimeter Länge an der Tibiadiaphyse gewählt. Nach der Osteotomie wurde das Periost um die Osteotomiestelle entfernt. Zur Stabilisierung wurde die Tibia mit einer 11-Loch-3.5mm-LC-DCP medial fixiert und die operierte Hintergliedmaße mit einem Scotchcastverband versehen. Anschließend wurden die Tiere für die folgenden 4 Wochen in speziellen Aufhängesystemen gehalten. Radiologisch wurden die Tiere sowohl nach Ende der Operation als auch 4 und 8 Wochen später untersucht. Nach Tötung der Tiere 12 Wochen nach Operation wurde die entsprechende Tibia entnommen und die Osteotomie radiologisch, histologisch und histomorphometrisch untersucht. Transplantation von autologer Spongiosa führte zu nahezu vollständiger Knochenheilung 12 Wochen nach Defektsetzung. Radiologische sowie histomorphometrische Untersuchungen zeigten eine signifikant höhere Knochendichte und Knochenneubildungsrate als die übrigen Gruppen. Zwar verbesserte sich die Knochenheilung mit steigender Konzentrationserhöhung des PTH₁₋₃₄, allerdings konnte kein signifikanter Unterschied zur alleinigen Defektauffüllung mit Fibrinhydrogel gesehen werden. Histologisch wiesen die Defekte nach Verwendung von Fibrinhydrogel ohne oder mit der höchsten PTH₁₋₃₄-Konzentration (PTH_{high}) ein hohes Maß an Osteoblasten und Osteoidsäumen und keine Gelpersistenz auf. Jedoch führte insbesondere die alleinige Verwendung von Fibrinhydrogel zu einer inflammatorischen Reaktion im Sinne von Lymphozyteninfiltration im Bereich des Defekts. Diese war jedoch signifikant geringer ausgeprägt nach Kombinationstherapie von Fibrinhydrogel mit der höchsten PTH₁₋₃₄-Konzentration (PTH_{high}).

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die lokale Abgabe von PTH₁₋₃₄ aus Fibrinhydrogel sicher und machbar ist, und die Kombination mit PTH₁₋₃₄ die inflammatorische Reaktion von Fibrinhydrogel dämpft. Größere Studien mit höheren PTH₁₋₃₄-Konzentrationen sind notwendig, um geeignete PTH₁₋₃₄-Konzentrationen zu finden und ihre Effektivität im Vergleich zu autologer Knochenspongiosa zur Knochendefektbehandlung zu untersuchen.

Summary

The aim of this study was to evaluate the ability of locally delivered PTH₁₋₃₄ and its specific concentration in fibrin to promote the synthesis of new bone in a segmental, full thickness defect in the midshaft of the ovine tibia. Different concentrations of bioactive PTH₁₋₃₄ were tested and their performance analysed; in addition, each concentration was tested against empty defects, defects receiving fibrin alone and those receiving an autograft (autologous bone spongiosa) to assess the efficacy of PTH₁₋₃₄. 28 female sheep were randomized into 5 groups of 5 (Empty), 6 (Fibrin), 6 (PTH_{low}), 6 (PTH_{high}), 5 (Autograft) animals each. In group Empty the defect was left empty, group Fibrin received fibrin alone, group PTH_{low} received a low concentration of PTH₁₋₃₄, group PTH_{high} a slight higher concentration of PTH₁₋₃₄ in a fibrin based hydrogel and positive control group received transplantation of autologous cancellous bone (Autograft). The study was based on the hypothesis that locally applied PTH₁₋₃₄ enhances new bone formation when delivered in a fibrin hydrogel. A standardized 1 cm full thickness cortical defect in the mid tibial diaphysis was chosen to test the bone healing potential of this osteogenic gel. After osteotomy and careful resection of the periosteum the tibia was stabilized using an 11-hole 3.5mm LC-DCP. The affected hindlimb was protected with a cast and the animals were kept in special suspension systems for four weeks after surgery to avoid spontaneous refracturing of the limb. Radiographs were taken directly after surgery as well as 4, 8 and 12 weeks thereafter. The animals were sacrificed after a postoperative period of 12 weeks and the tibia was removed. The osteotomy sites were examined radiographically, histologically and histomorphometrically. Transplantation of autologous cancellous bone resulted in bridging of the segmental tibia defect and complete bone healing. Radiological and morphometric evaluation showed a significant higher bone density and new bone formation rate than in the other groups. New bone formation increased and fracture healing was enhanced with rising concentrations of

PTH₁₋₃₄. However, no significant difference in defect replenishment compared with fibrinhydrogel alone (Fibrin) could be seen.

Histologic assessment showed a hypertrophy of osteoblasts and no hydrogel persisted after the use of fibrinhydrogel without or with the highest PTH₁₋₃₄. However, lymphocyte infiltration was present in all groups treated with fibrinhydrogel. This inflammatory response was significantly reduced in the presence of the highest PTH₁₋₃₄ concentration (PTH_{high}). This study showed that the protracted, local delivery of PTH₁₋₃₄ from a fibrinhydrogel is safe and feasible and the combination with PTH₁₋₃₄ decreases the inflammatory reaction of fibrinhydrogel. Larger studies with higher PTH₁₋₃₄ concentrations are required to find the optimum PTH₁₋₃₄ concentration and to examine its efficacy in promoting bone synthesis. Again, the impact of inflammation on bone healing and the interaction of PTH₁₋₃₄ with leucocyte infiltration has to be assessed in future trials.

1 Einleitung

1.1 Problemstellung

Die Tatsache, dass Knochendefekte ab einer „kritischen Größe“, die von der Lokalisation des Defektes abhängig ist, nicht wieder spontan heilen können, stellt nach wie vor ein wichtiges klinisches Problem dar¹. Solche ossären Defekte können z.B. durch Frakturen, Tumoren oder Zysten verursacht werden. Um die Kontinuität des Knochens und seine mechanische Belastbarkeit wieder herzustellen, müssen diese Defekte mit Ersatzmaterial aufgefüllt werden. Hierfür wird bis heute vorwiegend autogener bzw. allogener Knochen verwendet. Die Defektauffüllung mit auto- oder allogenem Knochen erfolgt in den USA rund 250 000 mal jährlich². Der Einsatz von autogenen Knochentransplantaten ist allerdings mit zahlreichen Nachteilen verbunden. So sind einerseits die Verlängerung der Operationszeit mit Erhöhung des Narkoserisikos und der Kosten zu nennen³. Andererseits ist die am Beckenkamm zu gewinnende Knochenmenge begrenzt, es entsteht ein Verlust an Knochenvolumen und es besteht dort stets die Gefahr von weiteren Komplikationen⁴⁻⁷. Auf die Entnahme im Beckenkamm kann verzichtet werden, wenn Spendermaterial zum Einsatz kommt. Die Verwendung von allogenem Spenderknochen birgt jedoch die Gefahr einer potentiellen Übertragung von infektiösen Erregern. Deshalb ist die Entwicklung von Knochenersatzmaterialien von großer Bedeutung. Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen ist derzeit der Einsatz von Hormonen und Wachstumsfaktoren zur Induktion der Knochenneubildung. Für Hormone (GH, PTH) und Wachstumsfaktoren (u.a. TGF, IGF-I, BMP-2,-4) konnte in mehreren tierexperimentellen Arbeiten ein stimulierender Einfluss auf die Knochenheilung gezeigt werden⁸⁻²⁴. Angesichts neuer molekularbiologischer Technologien wie den „local drug delivery“-Systemen müssen die osteostimulierenden Veränderungen in vivo dargestellt werden, um gezielte Therapiekonzepte entwerfen zu können.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Mit dieser experimentellen Arbeit sollte die Möglichkeit der verzögerten, lokalen Freisetzung des Wachstumsmediators PTH₁₋₃₄ aus einem Fibrinhydrogel für den Einsatz als osteostimulierende Substanz evaluiert werden. Um eventuelle konzentrationsabhängige Effekte zu erfassen, wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen von PTH₁₋₃₄ angewandt (PTH_{low}; PTH_{high}) und mit Kontrollen verglichen (Autografts, Leerproben, Fibrinfüllung). Als Modell diente hierbei die Füllung eines 1 Zentimeter messenden diaphysären Osteotomiedefektes der Tibia beim Schaf. Mittels radiologischer und histologischer Untersuchungen der Osteotomiestelle sollten die Reaktion des Knochens und des umliegenden Gewebes ausgewertet werden. Histomorphometrische Untersuchungen wurden durchgeführt, um den Prozentsatz des neuen Knochens und der fibrösen Gewebearordnung zu vergleichen. Mikroskopische Untersuchungen lieferten Informationen zur zellulären Reaktion und zum Resorptionsverhalten des eingesetzten Materials.

2 Literaturübersicht

2.1 Das Schaf als Versuchstier zur Studie von KEM

Für diese Studie wurde das Schaf als Versuchstier ausgewählt, da es sich in der Forschung der Knochenheilung seit längerer Zeit bewährt hat²⁵⁻²⁷. Die primäre Knochenheilung und das Remodeling des Haver'schen Systems sind beim Schaf sehr ausführlich beschrieben worden²⁷. Da dieses Projekt der humanen Forschung dient, wäre hinsichtlich der knöchernen Regeneration und der knöchernen Sekundärstrukturen auch der Hund als adäquates Tiermodell in Erwägung zu ziehen gewesen²⁸. Dieser zeigt jedoch gegenüber dem Menschen einen zeitlich schneller ablaufenden Knochenstoffwechsel und damit auch eine schnellere Frakturheilung. Aufgrund der dem Menschen ähnlichen Knochenumbaurate bei Schafen, diverser Vorgängerprojekte am Schafmodell und der heftigen ethischen und moralischen Kritik an Hundetierversuchen wurde in unserer Forschungsgruppe vom Hundemodell Abstand genommen. Auch der Einsatz von Primaten konnte trotz großer knöcherner Übereinstimmung zwischen diesen und dem Menschen aus ethischen Gründen nicht in Erwägung gezogen werden. Das Schwein und das Kaninchen sind tierexperimentell oft eingesetzte Modelle, die jedoch hinsichtlich der Dynamik der Knochendefektheilung im Vergleich zum Schaf weniger geeignet erscheinen²⁹. In der Vergangenheit wurde die spezielle Knochenzusammensetzung verschiedener Spezies untersucht und man kam zu dem Ergebnis, dass der Hund und das Schwein hinsichtlich dieser Komponenten, jedoch nicht der Umbaurate des Knochens dem Menschen am ähnlichsten sind³⁰. Da in dieser Arbeit die Dynamik der Knochenheilung im Vordergrund stand, blieb diese Studie unberücksichtigt. Das Kaninchen eignet sich grundsätzlich für die Grundlagenforschung, da es wie das Schaf ein differenziertes Heilungsverhalten zeigt²⁹. Die Knochendefektheilung findet bei Kaninchen jedoch in sehr kurzer Zeit statt, was die Erforschung einzelner Zeitpunkte erschwert und auch den Vergleich mit der Frakturheilungszeit beim Menschen unmöglich macht^{29,31}. Kleine Nager sind für die Erforschung der Frakturheilung weniger geeignet, da sie primitivere Knochen ohne Haver'sches System aufweisen²⁷. Des Weiteren konnte aufgrund der Tiergröße und dem damit verbundenem größeren Aufwand in Unterbringung und Versorgung und, im Falle der Pferde, der größeren Komplikationsrate

dem Einsatz von Rind und Pferd aus ökonomischer und ethischer Sicht nicht zugestimmt werden. Da die für Pferd oder Rind benötigten Osteosynthesen in keiner Weise mit den in der Humanmedizin verwendeten übereinstimmen würden, kamen diese Tierarten auch aus praktischen Gründen, trotz den dem Menschen sehr ähnlich langen Heilungszeiten, nicht als Tiermodelle in Frage³².

2.2 Knochenersatzmaterialien

2.2.1 Anforderungen an Knochenersatzmaterialien

An Knochenersatzmaterialien müssen zahlreiche Anforderungen gestellt werden. Auf die wichtigsten soll hier kurz eingegangen werden:

Biokompatibilität

Darunter versteht man die Fähigkeit eines Materials, bei bestimmter Anwendung die angemessene Gewebereaktion hervorzurufen. Bei Knochenersatzmitteln bedeutet das eine bindegewebs- und entzündungsfreie Knochenbindung³³. Die Biokompatibilität muss vor allem bei degradierbaren Materialien sorgfältig untersucht werden, da die Degradationsprodukte den pH-Wert ihrer Umgebung ändern, das Gewebe durch ihre Akkumulation schädigen oder selbst toxische Effekte haben können^{34,35}. Weiterhin dürfen die eingebrachten Materialien weder immunogen noch kanzerogen sein³⁵.

Osteointegration/Osteokonduktion/Osteoinduktion

Das Ersatzmaterial muss das Knochengewebe dazu anregen, in das Implantat einzuwachsen und so als „Leitschiene“ für die knöcherne Durchbauung dienen. Wünschenswert wäre zusätzlich eine osteoinduktive Wirkung, also eine Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen zu Osteoprogenitorzellen³⁶. Eine osteostimulierende Wirkung, also eine Anregung des Knochenstoffwechsels, könnte das Einwachsen des Knochengewebes und die Heilung des Defektes beschleunigen.

Resorbierbarkeit

Vor allem aus biomechanischer Sicht ist es sinnvoll, resorbierbare Knochenersatzmittel zu verwenden, da Knochen einem stetigen Umbau unterworfen ist und sich so an veränderte mechanische Belastungen anpassen kann. Der Einbau bzw. die Degradation sollte zeitgerecht erfolgen, d.h. das Ersatzmaterial sollte nicht schneller abgebaut werden, als neues Knochengewebe nachwachsen kann³⁵.

Weitere Anforderungen an Knochenersatzmittel sind die Sterilisierbarkeit, Form- und Bearbeitbarkeit unter Operationsbedingungen sowie akzeptable Herstellungskosten.

2.2.2 Einteilung der Knochenersatzmaterialien

Die Knochenersatzmittel werden aufgrund ihrer Herkunft in autologe, allogene und xenogene Materialien unterteilt. Daneben werden alloplastische Knochenersatzmaterialien aus voll- oder halbsynthetischer Fertigung als Implantate verwendet.

Tab.2.1: Vor- und Nachteile und die Wirkungsweisen der einzelnen KEM-Arten ³⁷

<u>Autologe Knochentransplantate</u> Innerhalb des selben Individuums	
<i>Vorteile</i>	<ul style="list-style-type: none"> • keine immunologische Abwehrreaktion • Osteoinduktion und Osteogenese • Osteokonduktion • Maximale Biokompatibilität (weder toxisch, antigen, mutagen, noch kanzerogen)
<i>Nachteile</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Begrenzte Verfügbarkeit und Lagerfähigkeit • Hohe Kosten (z.B.: durch Zweiteingriff, Lagerhaltung, etc.) • Verlängerte Operationsdauer • Komplikationen am 2. Operationsort (z.B.: Infektionen, Nervläsionen, Hämatome) <p>Komplikationsrate 10%</p>
<u>Allogene und xenogene Knochentransplantate</u> Innerhalb der selben und verschiedener Spezies	
<i>Vorteile</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Lagerung in Knochenbanken • Unbegrenzt verfügbar • Osteokonduktion • Keine Risiken durch zusätzliche operative Maßnahmen
<i>Nachteile</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Möglichkeit der Antigenität • Unsichere Wirkung wegen inhomogener Zusammensetzung • Infektionsübertragung (z.B.: bovine spongiforme Enzephalopathie, HIV, Hepatitis; bakterielle Kontamination) • Implantation devitaler Zellen • Verringerte biologische und biochemische Eigenschaften • Aufklärungs- und Haftungsproblematik • Hohe Kosten (z.B.: Lagerhaltung, etc.)
<u>Alloplastische Knochentransplantate</u> Vollsynthetische Herstellung eines Biomaterials	
<i>Vorteile:</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Gute Lagerfähigkeit • Nahezu unbegrenzt verfügbar • Meist resorbierbare Stoffe • Keine Risiken durch zusätzliche operative Maßnahmen • Keine Kontaminationsgefahr
<i>Nachteile</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Bindegewebige Einscheidung nicht resorbierbarer KEM (z.B.: Hydroxylapatit) • Entzündliche Gewebereaktionen • Nicht alle Ersatzstoffe sind sterilisierbar • Persistenz durch mangelnden/fehlenden Abbau

Außerdem erfolgt eine Unterscheidung, nach Ausgangsverbindungen³:

Biologisch organische KEM	Biologisch anorganische KEM
<ul style="list-style-type: none"> • autologer Knochen • Knochenmatrizen und Knochenextrakte • extrahierte Knochenwachstumsfaktoren • Kollagen 	<ul style="list-style-type: none"> • Hydroxylapatit (HA) aus Korallen • chemisch oder thermisch vorbehandelte Spongiosa
Synthetisch organische KEM	Synthetisch anorganische KEM
<ul style="list-style-type: none"> • Polymere (Polyethylenglykol=PEG) • Polyurethan • Polylactid 	<ul style="list-style-type: none"> • Kalziumphosphatkeramiken (TCP, HA) • Bioglas
Komposite Mischungen aus oben genannten Stoffen	

2.2.3 Autologe Knochenspongiosa

Autologer Knochen wird aufgrund seiner biologischen Aktivität nach der Transplantation immer noch als der „Goldstandard“ der Defektauffüllung angesehen. Der Vorteil daran ist, dass dieser sowohl osteokonduktive, –stimulative als auch osteoinduktive Effekte aufweist³⁸. Allerdings sind die Gewinnung und Transplantation, dessen Einwachsen und damit die Wiederherstellung der Kontinuität und der mechanischen Belastbarkeit des Knochens mit zahlreichen möglichen Komplikationen behaftet³⁵. So nehmen einerseits durch die Verlängerung der Operationszeit das Narkoserisiko und die damit verbundenen Kosten zu³. Andererseits ist die am Beckenkamm zu gewinnende Knochenmenge begrenzt, es entsteht ein Verlust an Knochenvolumen und es besteht dort stets die Gefahr von weiteren Komplikationen⁴⁻⁷. Die Heilung des Defektes nach Einbringung der Spongiosa beginnt mit der Revaskularisierung des Gewebes. Damit wird auch die Resorption der Spongiosa und somit die Freisetzung von Wachstumsfaktoren gestartet. Dies sorgt für den Zustrom der notwendigen Zellen für den Aufbau von neuem, vitalem, trabekulärem Knochen. Die Überbrückung des Defektes erfolgt von den Rändern her. Bei ausreichender Vaskularisation kann jedoch auch im Inneren Knochengewebe entstehen. Der neue Knochen formiert sich auf den transplantierten Trabekeln oder dringt in die kortikalen Anteile des Transplantats ein (creeping substitution)³⁹. Die über creeping substitution gebildeten Trabekel und die von ihnen eingeschlossenen avitalen Trabekel des Transplantates werden im Zuge des Remodeling wieder abgebaut. Der Abbau erfolgt durch Osteoklasten, Monocyten, Makrophagen evtl. auch über Fremdkörperriesenzellen. Das Remodeling führt wieder zu einem Geflechtknochen^{8,9}.

2.3 Wachstumsfaktoren

Aus dem Knochengewebe können verschiedene Wachstumsfaktoren isoliert werden.

Tab. 2.2: Überblick über die im Knochengewebe wirksamen Wachstumsfaktoren^{8,9}

• Bone-derived Growth Factor I (Mitglied der TGF- β -Familie) • Bone-derived Growth Factor II (β 2-Mikroglobulin)	• BDGF-I • BDGF-II; β 2-M	• Endothelial Cell Growth Factor	• ECGF
• Platelet-derived Growth Factor	• PDGF	• Saurer Fibroblast Growth Factor • Basischer Fibroblast Growth Factor (prostatic growth factor)	• aFGF • bFGF
• Skeletal Growth Factor • Niedermolekularer Skeletal Growth Factor	• SGF • IGF-II	• Transforming Growth Factor- β 1 • Transforming Growth Factor- β 2	• TGF- β 1 • TGF- β 2
• Insulin-like Growth Factor I • Insulin-like Growth Factor II	• IGF-I • IGF-II	• Ostoinductive factor	• OIF
• Epidermic Growth Factor	• EGF	• Bone morphogenetic proteins	• BMP

TGF- β wird u.a. von Osteoblasten als inaktive Form gebildet und in der Knochenmatrix lokal gebunden. Das über einen sauren pH-Wert oder durch Proteasen wie Plasmin oder Kathepsin aktivierte TGF- β ist der entscheidende Stimulator für die Matrixbildung durch Osteoblasten. IGF-I wird im Knochen selbst gebildet und steuert hier, wie unter anderem auch EGF und PDGF, die DNA-Synthese in den Osteoblasten und somit die Proteinsynthese. PDGF wird von den Thrombocyten bei der Gerinnung freigesetzt und hat einen entscheidenden Einfluss auf die Frakturheilung¹¹. Die osteostimulative Wirkung zeigte sich auch bei der lokalen Anwendung von IGF-1 im Tibiadeфекt, ebenso wie dessen antiinflammatorische Wirkung¹¹. Es konnte nachgewiesen werden, dass demineralisierter Knochen in Kombination mit TGF- β -Wachstumsfaktoren zu einer beschleunigten Osteoinduktion führen kann¹². Auch der Einsatz von alkalischem Fibroblast Growth Factor (aFGF), basischem Fibroblast Growth Factor (bFGF), Epidermic Growth Factor (EGF), Platelet-derived Growth Factor (PDGF), Skeletal Growth Factor (SGF) oder Insulin-like Growth Factor (IGF) konnte eine Stimulation der Osteoblastenaktivität bewirken. Jedoch zeigte sich dieser Effekt meistens nur in vitro oder in Kombination mit demineralisierten Knochenimplantaten. Der klinische Erfolg wurde durch zu schnelle Beseitigung der Wachstumsfaktoren aus dem Frakturspalt gehemmt^{13,14}. Folglich hat die Suche nach ausreichender Stabilisierung dieser Moleküle zu der Kombination mit resorbierbaren Baugerüstmaterialien wie Hydrogelen und Polyethylenglykol (PEG) geführt¹⁴⁻²¹. Auch die Kombination aus PEG und einem synthetischen Thrombinpeptid (TP508) konnte das Knochenwachstum in

experimentellen Radiusdefekten von Kaninchen stimulieren²¹. Gerade auf dem Gebiet der Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) wurde in letzter Zeit intensiv geforscht. BMPs ziehen, wenn sie in einer bestimmten Konzentration im Gewebe vorkommen, adulte Stammzellen an. Sie binden an Oberflächenrezeptoren dieser Zellen und stimulieren damit eine Differenzierung zu Osteoblasten. In vivo Experimente konnten zeigen, dass der Ablauf der Knochenneubildung bei der Implantation von BMP identisch ist mit der Kaskade der Osteoneogenese, wobei die Menge an neu gebildetem Knochengewebe proportional zur Menge an implantierten BMP ist⁹. Als Beweis für die Knocheninduktion gilt, dass ektopisches Knochenwachstum sowohl bei Ratten mit Alginatgelen, die mit BMP angereichert waren, entstand, als auch bei einer Kombination von PTH und BMP-2 bei lokaler Anwendung in Bandscheiben von Ratten^{20,22}. Nicht ektopisch angewandt, zeigte es eine Knochenneubildung in Femurdefekten von Schafen^{14,23}. Selbiges zeigte sich in Schädeldefekten von Kaninchen, als man BMP-2 in einem proteolytischen Hydrogel nutzte^{14,19,40 64}. Auch provozierte BMP-2 in Verbindung mit Transforming Growth Factor Beta 3 (TGF- β 3) erhöhte Knochenneubildung in Mäusen²⁴. Auf Fibrin basierende Hydrogele waren in Verbindung mit BMP-2 bei der Reparatur von Schädeldachdefekten in Ratten und in der Knochenüberbrückung klinischer Knochenbrüche bei Hunden und Katzen erfolgreich^{19,41}. Menschliche Fibroblasten, die genetisch mit BMP-7 transformiert wurden, waren fähig segmentale Oberschenkeldefekte in Ratten zu heilen, wenn sie als injizierbares Hydrogel angewandt wurden¹⁶.

2.4 Parathormon

Das Parathormon ist ein Peptidhormon (84 Aminosäuren), das in der Nebenschilddrüse gebildet wird. Die allgemein bekannte Hauptfunktion dieses Hormons ist die Erhöhung der Kalziumkonzentration im Blutserum. Eine Verminderung des Serumkalziumspiegels induziert eine vermehrte Sekretion dieses Hormons, was wiederum eine Signalkaskade einleitet, um Kalzium aus dem Skelett zu befreien, sowie den Kalziummetabolismus in der Niere zu fördern. Das Parathormon leitet seine Haupteffekte ein, indem es an den Oberflächenrezeptoren der Zelle bindet. Das Parathormon mobilisiert, wenn es ständig und in hohen Konzentrationen von der Nebenschilddrüse abgesondert wird, Kalziumionen aus dem Knochen. Dies geschieht durch osteoklasteninduzierte Knochenresorption⁴². Eine kontinuierliche Infusion hoher Dosierungen des Parathormons führt ebenfalls zu einer überwiegenden Aktivierung der

Osteoklasten mit daraus resultierendem Knochenabbau⁴³. Im Gegensatz dazu entfaltet sich eine osteoanabole Wirkung durch das synthetisch hergestellte Parathormon, vielmehr über sein 1-34 N-terminales Fragment, wenn dieses systemisch, intermittierend und in niedrigeren Dosierungen appliziert wird⁴⁴⁻⁴⁸. Diese Wirkung resultiert wahrscheinlich daraus, dass das 1-34 N-terminale Fragment eine ähnliche biologische Aktivität besitzt wie das vollständige Protein⁴⁹⁻⁵². Dieses Fragment bewirkt eine Bindung des PTH-Rezeptors an die osteoblastären Zellen. Durch diese Bindung wird die Lebensdauer von Osteoblasten und auch von Osteoklasten erhöht. Es erfolgt eine Erhöhung der Knochenmasse, welche sowohl in der endokortikalen Region^{42,45,53}, als auch in der Spongiosa statt findet⁴³. Insbesondere auf dem Gebiet der Osteoporose wurde der systemische Gebrauch dieses Hormons erforscht. 2006 wurde das erste Präparat in Deutschland zugelassen, nachdem es vor allem an Patientinnen mit postmenopausaler Osteoporose insofern erwünschenswerte Resultate erzielt hatte, als es nicht nur wie herkömmliche Präparate die Knochenresorption hemmt, sondern zusätzlich den Knochenaufbau stimuliert^{54,55}. Das hohe Frakturrisiko dieser Patienten wurde somit durch Hemmung des Knochenabbaus und durch Aufbau der Knochendichte gesenkt. Dies zeigte sich nach der subkutanen Applikation auf mikroskopischer Ebene durch signifikante Zunahme des trabekulären Volumens und der erhöhten Vernetzung der Trabekel^{54,56-58}. Auch bei der täglichen, subkutanen Injektion des Parathormons wurde von einer Steigerung des Knochenmetabolismus berichtet⁵⁹. In einer vorhergehenden Studie an unserer Abteilung wurde erstmalig der lokale Gebrauch dieses Hormons untersucht. Dabei wurde demonstriert, dass lokal angewandtes PTH₁₋₃₄ in Hydrogel auf Fibrinbasis osteostimulierend in einem „Drill Hole“-Modell an Schafen wirkt⁶⁰. Auch ergab die Anwendung des oben erwähnten Hydrogels eine komplikationslose Heilung einer auskürtierten subchondralen Knochenzyste bei einem Fohlen⁶¹. Der Versuch, selbiges Hydrogel in seiner Struktur noch mit Tricalciumphosphat (TCP)-Granula zu verstärken, zeigte bezüglich der Osteoneogenese Ergebnisse, die den Resultaten eines Autografts entsprachen⁶².

3 Material und Methoden

3.1 Knochenersatzmaterial

Im vorliegenden Fall wurde ein auf Fibrinkleber (Tissucol® Duo S, Baxter Schweiz AG Volketswil, Schweiz) basierendes Hydrogel appliziert. Das chemisch produzierte, humane PTH₁₋₃₄ geht mit der Fibrinmatrix eine spezifische kovalente Bindung ein. Durch diese zusätzlichen 12 Aminosäuren wird es somit verlängert. Die Verlängerung mit dem so genannten "TG-Haken" (TG-tag) enthält zwei physiologische Bindungsorte. Einer ermöglicht die enzymatische Bindung des Wachstumsfaktors zum Fibrin während des Vermischens der einzelnen Substanzen, während der zweite Bindungsort die proteolytische Abgabe von PTH₁₋₃₄ erlaubt und mit zwei zusätzlichen N- terminalen Aminosäuren an jeder Kette ausgestattet ist. Die Gelanordnung basiert auf dem natürlichen Prozess der Blutgerinnung. Alle Bestandteile dieses Systems sind flüssig, bis zu dem Zeitpunkt an dem sie gemischt werden⁶³.

Alle autologe Knochenspongiosa wurde vom Hüftkamm durch Stichinzision und anschließende Bohrung in die Crista iliaca mit Hilfe eines Rongeurs und eines scharfen Kürettierlöffel entnommen.

3.2 Aufbau der Studie

Für diese experimentelle Studie wurden insgesamt 28 Schafe als Versuchstiere verwendet. Sie wurden in 5 Gruppen {Empty (n=5), Fibrin (n=6), PTH_{low} (n=6), PTH_{high} (n=6), Autograft (n=5)} eingeteilt. Das Intervall vom Operationstag bis zur Tötung belief sich bei allen Tieren auf 12 Wochen. In Gruppe Empty wurde der Defekt nicht aufgefüllt, diese diente somit als negative Kontrollgruppe. In Gruppe Fibrin wurde der Defekt nur mit Fibrinhydrogel gefüllt, die Defektfüllung der Gruppe PTH_{low} enthielt zusätzlich eine geringe Konzentration von PTH₁₋₃₄, die der Gruppe PTH_{high}, eine etwas höhere PTH₁₋₃₄ – Konzentration.

Bei der Gruppe Autograft wurde der Defekt mit autologer Knochenspongiosa gefüllt. Die Hälfte der Tiere wurde an der linken Tibia, die andere Hälfte an der rechten Tibia operiert.

Tab.3.1: Übersicht über das jeweils eingesetzte Material

Gruppe	Schafnummer	verwendeter Knochenersatz	Wachstumsfaktor
Empty	12117	Leerprobe	Kein
	12119	Leerprobe	Kein
	12124	Leerprobe	Kein
	12125	Leerprobe	Kein
	12137	Leerprobe	Kein
Fibrin	12150	Fibrinhydrogel	Kein
	12151	Fibrinhydrogel	Kein
	12152	Fibrinhydrogel	Kein
	12153	Fibrinhydrogel	Kein
	12154	Fibrinhydrogel	Kein
	12155	Fibrinhydrogel	Kein
PTH _{low}	12122	Fibrinhydrogel	PTH ₁₋₃₄ (PTH _{low})
	12123	Fibrinhydrogel	PTH ₁₋₃₄ (PTH _{low})
	12133	Fibrinhydrogel	PTH ₁₋₃₄ (PTH _{low})
	12134	Fibrinhydrogel	PTH ₁₋₃₄ (PTH _{low})
	12135	Fibrinhydrogel	PTH ₁₋₃₄ (PTH _{low})
	12136	Fibrinhydrogel	PTH ₁₋₃₄ (PTH _{low})
PTH _{high}	12120	Fibrinhydrogel	PTH ₁₋₃₄ (PTH _{high})
	12121	Fibrinhydrogel	PTH ₁₋₃₄ (PTH _{high})
	12129	Fibrinhydrogel	PTH ₁₋₃₄ (PTH _{high})
	12130	Fibrinhydrogel	PTH ₁₋₃₄ (PTH _{high})
	12131	Fibrinhydrogel	PTH ₁₋₃₄ (PTH _{high})
	12132	Fibrinhydrogel	PTH ₁₋₃₄ (PTH _{high})
Autograft	1275	Autograft	Kein
	1276	Autograft	Kein
	12126	Autograft	Kein
	12127	Autograft	Kein
	12128	Autograft	Kein

3.3 Vorbereitung

Alle 28 verwendeten Schafe waren zwei- bis vierjährige (Durchschnitt: 2,3 Jahre alt), weibliche Tiere. Das Alter wurde anhand der Zähne beurteilt. Das Körpergewicht belief sich zwischen 44 und 80 kg (Durchschnitt: 63 kg). Die Tierversuche wurden nach den gesetzlichen Bestimmungen des schweizerischen Tierschutzgesetzes durchgeführt und vom kantonalen Veterinäramt bewilligt (Bewilligungsnr.: 185/2004). Bei allen neu erworbenen Schafen wurde eine Ankaufsuntersuchung durchgeführt. Den Schafen wurde ca. 2 ml Blut abgenommen und dieses serologisch auf Maedi/Visna-Antikörper untersucht. Positive Tiere wurden gekeult. Des Weiteren wurden Antiparasitika (Valbazen® 1,9%; p.o.; 4 ml/10 kg; Pfizer AG, Zürich, Schweiz und Baycox ® 5%; p.o.; 0,7 ml/2 kg; Provet AG, Lyssach, Schweiz) und Impfungen gegen Clostridien- und

Pasteurelleninfektion und Tetanus (Pulpivax®; s.c.; 2ml/Tier; Berna Veterinärprodukte AG, Bern, Schweiz) verabreicht. Die Impfung wurde im Rahmen der Grundimmunisierung nach 4 bis 6 Wochen wiederholt. Um Trächtigkeit der Versuchstiere auszuschließen, wurde den Tieren bei negativem transrektalem Ultraschallbefund eine zweimalige Prostaglandininjektion (Dinolytic®; i.m.; 2 ml/Tier; Pfizer AG, Zürich, Schweiz) appliziert. Eine Woche vor der Operation wurde 2 ml abgenommenes Blut hämatologisch und blutchemisch im Labor der Vetsuisse Fakultät Zürich untersucht, um eventuelle Anästhesierisiken auszuschließen. 24 Stunden vor der Operation wurden die Schafe gewogen, von oberhalb der Klaue bis zum Bereich der Hüfte und im Halsbereich geschoren, in eine mit Sägespänen eingestreute Box umgestellt und ihnen das Futter entzogen. Am Morgen der Operation wurde die rektale Temperatur gemessen, Herz, Pansen und Lunge auskultiert und die Narkose eingeleitet. Die Schafe wurden mit Xylazin i.m. (Rompun® 2%; 0,1 mg/kg; Provet AG, Lyssach, Schweiz) und Buprenorphin i.m. (Temgesic®; 0,3 mg/10 kg; Essex Chemie AG, Luzern, Schweiz) prämediziert. Zwanzig Minuten später wurden die Tiere in den Operationssaal geführt. Die geschorene Stelle am Hals wurde mit Hibiscrub®-Seife gewaschen, mit siebzigprozentigem Alkohol entfettet und mit Hibitane® (Zeneka AG, Luzern, Schweiz) desinfiziert. Zur Lokalanästhesie wurde 1 ml Lidocain-Hyaluronidase 2% (G. Streuli & Co AG, Uznach, Schweiz) s.c. an der vorgesehenen Kathetereinstichstelle injiziert. Dann wurde ein Venenverweilkatheter (Vygonüle® S G14; Vygon GmbH; Aachen; Deutschland) in die Vena jugularis gelegt und ein IN-Stopper (Braun Melsungen AG; Melsungen, Deutschland) als Verschluss aufgesetzt. Der Venenverweilkatheter wurde mit einem nichtresorbierbaren Nahtmaterial (Supramid® 2/0; Aesculap AG & Co, Tuttlingen, Deutschland) angenäht. Präoperativ wurden den Tieren die Antibiotika Benzylpenicillin (Penicillin Natrium; 30'000 I.U./kg; G. Streuli & Co AG, Uznach, Schweiz) und Gentamicin® (Vetagent 4 mg/kg; Veterinaria AG, Zürich, Schweiz) i.v. injiziert. Als nichtsteroidales Antiphlogistikum wurde Caprofen (Rimadyl®; 4 mg/kg; Pfizer, Vertrieb Dr.E.Gräub AG, Bern, Schweiz) i.v. gegeben. Zusätzlich wurde equines Tetanusantitoxin (Tetanus-Serum Intervet®; 3000 I.U.; Veterinaria AG, Zürich, Schweiz) s.c. appliziert.

Die Anästhesie wurde mit Ketamin (Narketan®10; 2 mg/kg; Vetoquinol AG, Bern, Schweiz) i.v. und Diazepam (Valium®; Roche Pharma AG, Rheinach, Schweiz) i.v. eingeleitet und bei Bedarf zusätzlich mit Propofol (2-4 mg/kg; Fresenius Kabi AG, Stans, Schweiz) i.v. vertieft. Der Kehlkopf wurde mit einem Lidocainspray (Xylocain®

Spray; 10 mg/Tier; Astra Pharmaceutica AG, Dietikon, Schweiz) lokal anästhesiert, woraufhin endotracheal intubiert wurde. Zur Aufrechterhaltung der Anästhesie kam 1-1,5% Isofluran-Sauerstoff-Inhalation (Forene®; Abbott AG, Baar, Schweiz) zur Anwendung. Es wurde ein arterieller Venenkatheter zur Blutgasmessung gelegt und eine Infusion mit Ringerlaktat an den Venenkatheter angehängt. Gegen die Austrocknung der Kornea wurde eine Augensalbe (Vitamin A Dispersa® ; Novartis AG, Basel, Schweiz) intraokulär appliziert.

3.4 Operation

Der operative Zugang an die Schienbeindiaphyse wurde von medial durchgeführt. Der Schnitt mit Hilfe des Elektrokauters wurde bis zur Höhe des Metatarsus verlängert. Er führte durch die subkutane und mediale Faszie des Schienbeins und stellte den Knochen dar, ohne das Periost zu zerstören.

Eine 3.5 mm breite 11-Loch-LC-DCP (Synthes®, Modell 248.110, Oberdorf, Schweiz) (Abb.3.1) wurde der Diaphyse der Tibia mittels eines Plattenbiegers (Synthes®, Oberdorf, Schweiz) nachgeformt, ihr distales Ende endete 2 cm über dem Tibiotarsalgelenk. Die Platte wurde am Knochen mit elf 3.5-Millimeter- Schrauben (Synthes®, Modell 204.022-032, Oberdorf, Schweiz) befestigt und es wurden fünf Schraubenbohrungen proximal und sechs distal zum geplanten Osteotomiespalt wie folgt ausgeführt. Zuerst wurde distal das zehnte Loch gebohrt, die Schraubenlänge gemessen, das Gewinde geschnitten und die Schraube eingedreht. In gleicher Weise wurde die zweite proximale Schraube gesetzt. Abgesehen von den beiden osteotomienahen Schrauben (sechste und siebte) wurde bei den restlich zu setzenden Schrauben vorerst nur das Loch gebohrt, dann hintereinander die Schraubenlängen gemessen und die Gewinde geschnitten. Die vierte und achte Schraube wurde exzentrisch gebohrt, um eine Abstützfunktion innerhalb der Platte zu erreichen und ein Kollabieren des Knochendefektes durch Verschieben der Platte gegenüber den Knochenfragmenten zu vermeiden. Danach wurde der Defekt auf dem Knochen mit einer Skalpellklinge und dem Elektrokauter unter Verwendung eines Maßinstrumentes angezeichnet, um dadurch einen standardisierten 1-cm-Defekt zwischen der 5. und 6. Schraubenbohrung sicherzustellen. Die Schrauben und die Platte wurden entfernt. Mit einer oszillierenden Säge (Synthes®, Kat Modell 518.010, Sägeblatt Modell 312.280; Oberdorf, Schweiz) wurde der Defekt unter konstanter Spülung von 0.09% Kochsalzlösung gesägt (Abb.3.2). Zur Schonung der weichen Gewebe wurden von

kranial und von kaudal der Tibia in Defekthöhe zwei Hohmannhebel eingesetzt. Das 1 cm große Segment einschließlich des Periosts der Defektumgebung wurde sorgfältig entfernt. Von Knochenmark und umgebendem weichen Geweben ausgehende lokale Blutungen wurden durch Druck mit dem Gazetupfer gestoppt (Abb.3.3). Die Tibia wurde repositioniert, die Platte erneut angelegt und alle Schrauben wieder eingefügt, um die Schienbeindiaphyse zu stabilisieren (Abb.3.4). Die beiden letzten, fraktur-nahen Schrauben (Schraube 5 und 6) wurden vom Defekt weg, schräg zur Längsachse des Knochens und neutral gesetzt. Sorgfältig wurden alle Blutgerinnsel und Knochenrückstände entfernt, bevor das Hydrogel mit Hilfe einer Applikationsspritze in den Knochendefekt gefüllt wurde. Das Hydrogel wurde gleichmäßig verteilt und füllte den Bruchspalt vollständig aus. Für die positive Kontrollgruppe wurde der vom Beckenkamm entnommene autologe Knochen benutzt, um den Bruchspalt vollständig auszufüllen. Die mediale Faszie wurde dann routinemäßig mit Vicryl 2/0 (FS-1, Ethicon®, Johnson-Johnson Int., USA) durch eine einfache fortlaufende Naht nach Kürschner geschlossen und die Haut als letzte Schicht geheftet (Signet 35W®, Selbstnähte, Connecticut, USA). Während die Tiere noch narkotisiert waren, wurde das Schienbein von kaudodorsal (60 kV und 0.2 sec) und mediolateral (60 kV und 0.2 sec) geröntgt. Zur Wundabdeckung wurde eine sterile Saugkompressen (Mesorb®; Mölnlycke Health Care AB, Göteborg, Schweden) angebracht. Die gesamte Extremität wurde mit unbeschichteter Watte gepolstert, mit einer elastischen, selbstklebenden Binde (Elastomull®Haft; BSN medical GmbH & Co., Hamburg, Deutschland) fixiert und dann mit Papierkreppbinden (Cello-Crêpe®; IVF Hartmann AG, Neuhausen, Schweiz) umwickelt. Ein Castverband (Scotch Cast®Plus; 7,6 cm; Laboratoires 3M Santé, Frankreich), der die gesamte distale Extremität von proximal der Patella beginnend erfasste, wurde angelegt. Dadurch konnte eine Immobilisierung der gesamten Gliedmaße und eine Verringerung der Dreh- und Scherkräfte auf das Schienbein erreicht werden. Über den Castverband wurde eine Pflasterbinde (Isoelast®; IVF Hartmann AG Neuhausen, Schweiz) gewickelt und die Enden mit Klebeband (Tesa® AG, Hamburg, Deutschland) festgeklebt. Danach wurden die Schafe in eine Box mit einem Aufhängesystem aus Netzen transportiert. Dieses Aufhängesystem verhindert das Abliegen und Aufstehen und das dadurch mögliche erneute Brechen des Beines. Die Tiere wurden für 4 Wochen im Aufhängesystem gehalten, in denen sie in ihren Stallungen (1 m x 2 m) umhergehen und problemlos schlafen, fressen, urinieren und Kot absetzen konnten. Danach wurden sie für den Rest der Studienperiode in Gruppen

von 2-3 Tieren in kleinen Ställen gehalten (4 m x 6 m). Alle Castverbände wurden für 12 Wochen beibehalten, wobei nach 4 und 8 Wochen diese jeweils gewechselt wurden. Eine Entfernung der Klammern fand nach 4 Wochen statt. Ein frühzeitiger Castverbandswechsel wurde durchgeführt, sobald Tiere Probleme mit der Gewichtsbelastung, erhöhte Temperatur oder Schwellung zeigten. Bei dem Castverbandswechsel nach 8 Wochen wurde nur bis zum Metatarsus gecastet und die Klaue frei gelassen, um eine physiologische Belastung dieser zu erzielen. Anschlußröntgenbilder durch den Gipsverband wurden nach 4 und 8 Wochen genommen.

3.5 Probenaufbereitung und Probenauswertung

3.5.1 Gewinnung und Aufbereitung der Proben

Alle Schafe wurden nach 12 Wochen getötet. Hierzu wurden sie mit einem Bolzenschuss betäubt, am nicht operierten Hinterbein aufgehängt und entblutet. Die operierte Tibia wurde herausgetrennt und mit Skalpell und Pinzette freipräpariert. Die Tibia wurde sowohl mit als auch ohne Platte von medial, kranial und kaudal mit einer Digitalkamera (Minolta Dimage 7; Minolta Europe GmbH, Langenhagen, Deutschland) fotografiert und adspektorisch und palpatorisch untersucht. Abschließende Röntgenbilder von mediolateral und anterioposterior des Schienbeins wurden mit einem Faxitron durchgeführt (Schrack Xstrahl-faxitron Reihe, Modell 43855A, Hewlett Packard®, USA; Kodak PPL-2, Kodak, USA). Mit einer Bandsäge (Kolbe® Maschinenteknik GmbH, Elchingen, Deutschland) wurde je 1-2 cm distal bzw. proximal des sechsten bzw. des fünften Schraubenlochs die Tibia durchsägt. Das herausgesägte Knochenstück mit inliegendem Defekt wurde für eine Woche in 4%igem gepufferten Formalin bei Zimmertemperatur konserviert. Zur Dehydratation folgte eine aufsteigende Alkoholreihe. Hierzu wurden die Proben in 50%igen Alkohol gelegt, der dreimal im Abstand von 30 min gewechselt wurde. Daraufhin wurden sie zweimal 12 h in 70%igem, zweimal in 80%igem, zweimal in 90%igem und viermal 12 h in 100%igem Alkohol entwässert. Es folgte eine viertägige Entfettung unter Vakuum in Xylol bei Raumtemperatur. Das Xylol wurde nach dem ersten Tag gewechselt. Die Infiltration mit Methylmetacrylat (MMA) erfolgte im Zeitraum von einer Woche unter Vakuum bei 4 °C. Die Herstellung des Methylmetacrylats erfolgte folgendermaßen: Methacrylsäuremethylester (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz), Dibutylphthalat (Merck-Schuchardt® OHG, Hohenbrunn, Deutschland) und Perkadox 16 (Dr. Grogg Chemie AG, Stetten, Schweiz) wurden im Verhältnis 89,5: 10: 0,5 gemischt und 10 min lang mit einem Magnetrührer homogenisiert. Danach wurden die Proben in frisches MMA in Gläsern mit Deckeln eingebettet und für mehrere Tage bei 4 °C im Kühlschrank zur Polymerisation verwahrt. Falls diese nach 2 Wochen noch nicht eingetreten war, wurden die Proben in ein Wasserbad bei Raumtemperatur verbracht. Nach Entnahme der Blöcke aus den Gläsern wurden sie mit der Bandsäge geometrisch so zugesägt, dass überstehendes MMA ohne Verletzung des Knochens entfernt wurde. Unterhalb blieb ein Stift ausgespart, um den Block besser in einem Plastikrahmen befestigen zu können. Die Blöcke wurden mit Historesinplastikkleber an den

Plastikrahmen befestigt, dieser Kleber setzt sich aus einem flüssigen (Leica® Historesin Mounting Medium liquid component, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland) und einem pulverigen Bestandteil (Leica Historesin Mounting Medium powder component, Leica® Microsystems, Nussloch) zusammen. Nach Aushärtung wurden mit einer Präzisionsinnenlochsäge (Leica® SP1600, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) aus diesen Blöcken 400 µm starke Dickschnitte hergestellt. Die Schnittebene entsprach hierbei einem paramedianen Schnitt durch die Stelle des jeweiligen Scheitelbeins, in der der Tibiadefekt seine maximale Größe aufwies. Diese Dickschnitte wurden mit Alkohol entfettet und auf ebenfalls mit einer Alkoholspülung vorbereitete Acrylglasplatten (Perspex® GS 3mm; Wachendorf AG Technische Industrieprodukte, Basel, Schweiz) aufgeklebt (Klebstoff: Cementit® CA12; Merz+Benteli AG, Niederwangen, Schweiz). Mit einer Schleif- und Poliermaschine (Planopol-V® 401; Struers A/S, Rodovre, Dänemark) wurden diese anschließend auf eine Dicke von circa 300 µm geschliffen. Von den entstandenen Schnitten wurde eine Mikroradiographie (27 kV, 11 sec, 3 mA; Faxitron X-Ray System, Hewlett Packard®, Mc Minnville Division, Oregon, USA) angefertigt und diese danach für die histomorphometrische Untersuchung einer Oberflächenfärbung mit Toluidinblau unterzogen. Anschließend wurde der Block mit einer kleineren Bandsäge (PROXXON® Typ MBS 230/E No 27170, Niersbach, Deutschland) erneut zugesägt, so dass nur noch der Bereich um die Osteotomiestelle intakt blieb. Diese Proben wurden in frisches Methylmetacrylat in spezielle luftdichte Teflonformen eingebettet und einen Tag lang in einem 37 °C warmem Wasserbad zur Polymerisation aufbewahrt. Nach Aushärtung der Blöcke, erneutem Ankleben von Plastikrahmen (mit Leica® Historesin Mounting Medium) und Beschriften waren die Blöcke bereit zum Sägen. Mit der Präzisionsinnenlochsäge (Leica® SP1600, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) wurden die Proben präzise angesägt, so dass mit einem Mikrotom (Leica® RM 2155; Leica Instruments GmbH, Nussloch Deutschland) 5 µm dünne Schnitte angefertigt werden konnten. Diese Schnitte wurden dann mit Toluidinblau und der Von Kossa Färbung mit McNeal's Tetrachrom-Gegenfärbung eingefärbt.

3.5.2 Untersuchungsmethoden

Die histologischen Untersuchungen wurden an Dünnschnitten bei 1.25-, 100- und 200facher Vergrößerung am Lichtmikroskop (Leica® DMR; Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Deutschland) durchgeführt. Für die histomorphometrische Untersuchung wurden die gefärbten Dickschnitte von einem Makroskop (Leica® M420) aus bei 5.8facher Vergrößerung über eine Kamera (Leica® DC 200) mithilfe entsprechender Software (Leica® IM 1000) in einen Computer eingelesen. Zur Vermeidung nachfolgender Fehler des Histomorphometrieprogramms bei der Phasen-Detektierung wurde eine bildbearbeitende Software (Adobe Photoshop 6.0®) benutzt, um die verschiedenen Phasen (originärer Knochen (cyanblau), neuer Knochen (grün), fibröses Gewebe (pink) und Hintergrund (beige)) zu detektieren und anzufärben. Anschließend wurden mittels Leica QWin® und Leica Quips® die zu messenden Phasen detektiert und ihre Fläche berechnet.

3.5.3 Probenauswertung

3.5.3.1 Radiologie

Die Röntgenbilder von 4, 8 und 12 Wochen wurden von drei Rezensenten ausgewertet. Dies erfolgte verblindet, d.h. ohne dass den Rezensenten Gruppenzugehörigkeit oder Zeitpunkte bekannt waren. Ausgewertet wurde die Knochenformation (Knochenneubildung, Kallusbildung) an 3 verschiedenen Lokalisationen (Endostal, Cis- und Transkortex der Osteotomie (Abb. 3.5)).

Wenn sich die Knochenformation proximal und distal der kortikalen Defektgrenzen an Cis- und Transkortex unterschied, wurde der Mittelwert gewertet. Für den Parameter Osteoneogenese („Knochenformation“) wurde folgendes semiquantitatives Scoresystem erstellt:

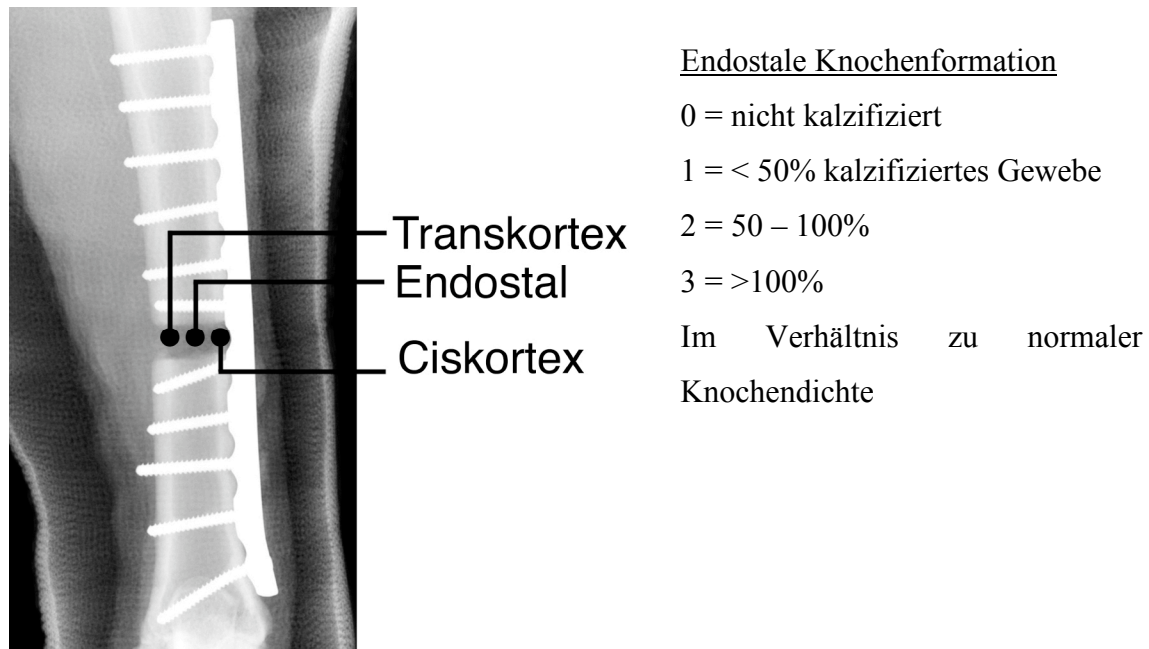


Abb. 3.5: Zoneneinteilung für Auswertung der Röntgenbilder

Knochenformation an Cis- und Transkortex

- 0 = kein Kallus u/o Kortikale Knochenformation
- 1 = Kallusformation , nicht in den Frakturspalt reinreichend
- 2 = Kallusformation, in den Frakturspalt hineinreichend
- 3 = komplette Überbrückung (Bridging) von Kortex u/o Kallusformation

3.5.3.2 Histomorphometrie der Dickschnitte

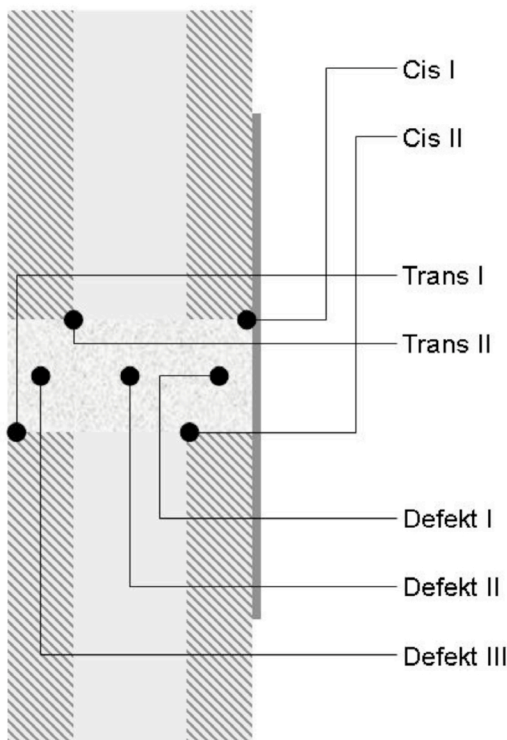
Bei der histomorphometrischen Untersuchung wurden die folgenden vier Phasen detektiert und ihre Fläche gemessen:

- Knochenneubildung
- fibröses Gewebe
- originärer Knochen
- Hintergrund

3.5.3.3 Semiquantitative Auswertung der Dünnschnitte

Da Variablen wie Umfang der Knochenneubildung oder Anteil des fibrösen Gewebes mit der Histomorphometrie exakt gemessen wurden, konnte auf deren semiquantitative Erfassung verzichtet werden.

Bezüglich des Auftretens von Makrophagen, Osteoklasten, Fremdkörperriesenzellen, Leukozyten, Fibrozyten und enchondraler Ossifikation wurden bei 100facher Vergrößerung 7 Ausschnitte in den in Abbildung 3.6 dargestellten Bereichen gewählt.



In diesen Ausschnitten wurde folgendes semiquantitatives Scoresystem gewählt:

Makrophagen, Leukozyten, Spindelzellen

0 = keine der jeweiligen Zellen
 1 = < 25%
 2 = 25-50%
 3 = > 50% des Flächenausschnittes mit den jeweiligen Zellen belegt

Osteoklasten, Fremdkörperriesenzellen

0 = keine der jeweiligen Zellen
 1 = > 5
 2 = 5-10
 3 = > 10 der jeweils einzeln ausgezählten Zellen

Enchondrale Ossifikation

0 = nicht vorhanden
 1 = vorhanden

Abb. 3.6: Zoneneinteilung für die semiquantitative Auswertung der Dünnschnitte⁶⁴

Für die Evaluation wurden die Werte der jeweiligen Zellen summiert.

3.5.4 Statistische Untersuchung

Die gewonnenen Ergebnisse wurden mit Hilfe einer Statistiksoftware (StatView®; Abacus Inc., Berkeley, USA) analysiert. Die quantitativen Daten der Histomorphometrie und die Daten der semiquantitativen Scoresysteme wurden einer faktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) sowie einem Korrelations-Z-Test (Fisher's PLSD post-hoc-Test) unterzogen. Ein P-Wert von < 0,05 wurde als statistisch signifikant erachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Operation

Die Operation wurde bei 27 Schafen wie geplant durchgeführt. Bei Schaf Nr.12134 (PTH_{low}) brach beim Schneiden des Gewindes der distalen, osteotomienahen Schraube der Gewindeschneider ab (s.Abb.4.1; 8Wo). Diese Gewindeschneiderspitze von 15 mm Länge beließ man in der Markhöhle der Tibia. Beim selben Tier wurde durch die distale Schraube das Tibiotarsalgelenk arthrodesiert. Diese Schraube wurde in einem erneuten operativen Eingriff durch eine kürzere ersetzt. Die Tiere überstanden die Narkose komplikationslos. Das Einbringen des Hydrogels in den Tibiadeфекt gelang mithilfe der Applikationsspritze problemlos. Das Gel verdrängte im Defekt vorhandenes Blut, ohne sich mit diesem zu vermischen und blieb bis zum Aushärten für ca. 5 Minuten modellierbar. Bei den Schafen Nr.1276 (Autograft) und Nr.12137 (Empty) befand sich noch viel Blut im Osteotomiespalt, da die Blutung aus dem Knochenmark nur sehr schwer gestoppt werden konnte.

4.2 Postoperative Phase

In der postoperativen Phase kam es zu keinen schwerwiegenden Komplikationen, so dass alle Tiere innerhalb der geplanten Zeitabstände geschlachtet werden konnten. Auch wurde der Castverband von fast allen Schafen sowohl in der Hängevorrichtung als auch frei laufend in kleinen Boxen gut toleriert. Ein Schaf der Autograftgruppe (Nr.12129) zeigte weniger Toleranzbereitschaft, dreimal brach der Scotchcastverband und wurde jeweils neu angebracht, was jedoch die Frakturheilung selbst nicht beeinflusste. In allen Fällen, außer bei den Leerdefekten der Gruppe Empty, konnte eine Heilung per primam erzielt werden.

4.3 Radiologie

4.3.1 Radiologische Auswertung

Die genauen Daten der radiologischen Auswertung können Tabelle A.1 entnommen werden. Mittelwerte und Standardabweichungen der Ergebnisse der radiologischen Auswertung sind der Tabelle A.4, Röntgenbilder der Abbildung 4.1 und graphische Darstellungen dem Diagramm 4.1 zu entnehmen.

Tab.4.1: Übersicht der radiologischen Auswertung nach 4, 8 und 12 Wochen, Legende s.S.22

4 Wochen

Gruppe	Schafnr	Ciskortex	Transkortex	Endostal
Empty	12125		+	
PTH _{low}	12134			+
PTH _{low}	12135			+
Autograft	1275		++	
Autograft	1276	+	++	+
Autograft	12126		++	++
Autograft	12127	++		

8 Wochen

Gruppe	Schafnr	Ciskortex	Transkortex	Endostal
Empty	12119			+
Empty	12124	++		
Empty	12125	++	+	+
Empty	12137			+
Fibrin	12150			++
Fibrin	12151	+		+
Fibrin	12152	++		+
Fibrin	12153	++		
Fibrin	12154	++		+
Fibrin	12155			+
PTH _{low}	12122	+		
PTH _{low}	12123			++
PTH _{low}	12133	+	+	
PTH _{low}	12134	+		++
PTH _{low}	12135		++	++
PTH _{low}	12136	+		
PTH _{high}	12120	++		
PTH _{high}	12121	++		
PTH _{high}	12129	++		
PTH _{high}	12130	++	++	++
PTH _{high}	12132	++		+
Autograft	1275	++	+	+
Autograft	1276	++	++	++
Autograft	12126	++	++	++
Autograft	12127	++	++	++
Autograft	12128	+++		++

12 Wochen

Gruppe	Schafnr	Ciskortex	Transkortex	Endostal
Empty	12117	++		+
Empty	12119			+
Empty	12124	++		+
Empty	12125	++	++	+
Empty	12137		++	++
Fibrin	12150	+++		++
Fibrin	12151	+		+
Fibrin	12152	++		++
Fibrin	12153	++	++	++
Fibrin	12154	+++	+++	++
Fibrin	12155	++		
PTH _{low}	12122	+		
PTH _{low}	12123	++		+
PTH _{low}	12133	++	+	
PTH _{low}	12134	++		++
PTH _{low}	12135		+	+++
PTH _{low}	12136	++		+
PTH _{high}	12120	+++		+
PTH _{high}	12121	++		+
PTH _{high}	12129	++		+
PTH _{high}	12130	+++	++	+++
PTH _{high}	12131	++		
PTH _{high}	12132	++	++	+
Autograft	1275	+++	++	++
Autograft	1276	+++	+++	++
Autograft	12126	+++	+++	++
Autograft	12127	+++	++	++
Autograft	12128	+++	++	++

Diese Tabellen stellen die Veränderungen um den Osteotomiespalt nach einem Beobachtungszeitraum von 4, 8 und 12 Wochen dar.

Knochenneuf ormation: 0,5-1: +
1.5-2: ++
2.5-3: +++

4.3.1.1 Empty

Nach einem Beobachtungszeitraum von 4 Wochen stellte sich nur bei einem Tier (Nr.12125) eine Veränderung der Knochendichte um den Osteotomiespalt dar. Dort zeigte sich ein wolkenartiger röntgendichter Saum, der sich strukturell unregelmäßiger darstellte als der Röhrenknochen der Tibia. Dieser Saum legte sich im Bereich der Osteotomie an den Transkortex, ragte jedoch nicht in die Osteotomie hinein. Die Veränderungen nach 8 Wochen variierten stark. So konnten an einem Tier (Nr.12117) überhaupt keine solchen dargestellt werden. Bei 3 Tieren (Nr.12119, 12125, 12137) zeigte sich der Osteotomiespalt bis zu einem Viertel mit kalzifiziertem Gewebe gefüllt. An ciskortikaler Seite zeigte sich bei zwei Tieren (Nr.12124, 12125) ein röntgendichter Saum, der ungefähr 2 mm in den Osteotomiespalt ragte. Auf transkortikaler Seite war eine solche Veränderung nur bei einem Tier (Nr. 12125) sichtbar. Nach 12 Wochen zeigten sich bei 3 Tieren (Nr.12117, 12124, 12125) die gleichen Veränderungen an ciskortikaler Seite, auf transkortikaler Seite bei zwei Tieren (Nr.12125, 12137). Der Defektpalt war nach diesem Zeitraum unterschiedlich stark aufgefüllt. So zeigte sich eine Auffüllung von bis zu 25% (Nr. 12117, 12119), über 25% (Nr.12124, 12125) und über 50% (Nr. 12137).

4.3.1.2 Fibrin

Die Röntgenaufnahmen entsprachen 4 Wochen nach der Operation dem postoperativen Bild. Nach 8 Wochen zeigten sich an allen Tieren radiologische Veränderungen, bei keinem der Tiere war davon die transkorticale Seite betroffen. Auf ciskortikaler Seite zeigte sich eine starke Varianz der Veränderungen. So zeigten zwei Tiere (Nr.12150, 12155) keine, ein Tier (Nr.12151) leichte und die restlichen Tiere dieser Gruppe in die Osteotomie hineinragende Veränderungen der Knochendichte. In drei Fällen (Nr.12152, 12154, 12155) ließ sich der Osteotomiespalt zur Hälfte mit kalzifiziertem Gewebe angefüllt darstellen, bei einem Tier (Nr.12153) waren endostal keine Veränderungen darstellbar, bei den restlichen Tieren nur leichte. Nach 12 Wochen zeigten auf ciskortikaler Seite alle Tiere eine Veränderung der Knochendichte. Selbst die zwei Tiere (Nr.12150, 12155), die nach 8 Wochen noch keine Veränderungen aufwiesen, zeigten hier Bridging und Kallusformation. Diese Veränderungen zeigten sich auch bei zwei Tieren (Nr. 12153, 12154) an der transkortalen Seite. Der Defektpalt war endostal unterschiedlich stark gefüllt. Bei einem Tier (Nr.12155) blieb er ungefüllt, bei einem Tier waren 25% (Nr.12151), bei einem anderen 50% (Nr.12152) und bei dem

Rest der Gruppe über 50% gefüllt. Hydrogel konnte in keinem Osteotomiespalt angesprochen werden.

4.3.1.3 PTH_{low}

Nach 4 Wochen zeigte sich an zwei Tieren (Nr.12134, 12135) im endostalen Bereich des Osteotomiespalt ein Aufhellungsbereich mit der Röntgendichte spongiösen Knochens, der den Osteotomiespalt zur Hälfte einnahm. Nach 8 Wochen zeigte sich bei 4 Tieren der Gruppe auf ciskortikaler Seite ein röntgendichter Saum, der nicht (Nr.12122, 12133, 12134) oder nur teilweise (Nr.12136) in die Osteotomie einspross. Auf transkortikaler Seite zeigten sich bei 2 Tieren (Nr.12133, 12135) Veränderungen. Bei drei Tieren (Nr.12123, 12134, 12135) wurde der Osteotomiespalt bis über die Hälfte mit kalzifiziertem Gewebe ausgefüllt. Nach einem Beobachtungszeitraum von 12 Wochen breitete sich der röntgendichte Saum auf der ciskortikalen Seite bis 2 mm in den Osteotomiespalt aus. Nur ein Tier (Nr.12135) wies keine Veränderungen auf. Auf transkortikaler Seite zeigte sich der in die Osteotomie hereinragende Saum bei zwei Tieren (Nr.12133, 12135). Im endostalen Bereich variierte die Auffüllung mit kalzifiziertem Gewebe von 0% (Nr.12122) bis 75% (Nr.12135). Hydrogel konnte in keinem Osteotomiespalt angesprochen werden.

4.3.1.4 PTH_{high}

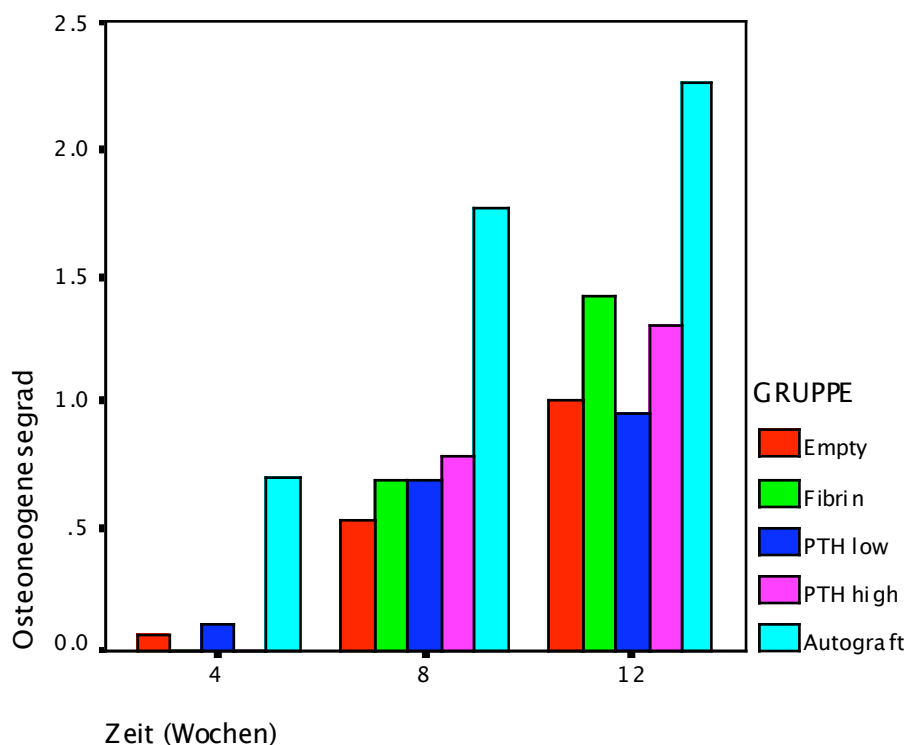
In der PTH_{high}-Gruppe waren nach 4 Wochen keine radiologischen Veränderungen sichtbar. Nach 8 Wochen zeigten sich auf ciskortikaler Seite, abgesehen von einem Tier (Nr.12131), bei der gesamten Gruppe Veränderungen der Knochendichte, die ungefähr 2 mm in den Osteotomiespalt hineinragten. Auf transkortikaler Seite zeigten sich die gleichen Veränderungen bei einem Tier (Nr.12130). Der endostale Bereich wurde bei einem Tier (Nr.12132) teilweise, bei einem zweiten (Nr.12130) bis über die Hälfte aufgefüllt. Nach einem Beobachtungszeitraum von 12 Wochen breitete sich der röntgendichte Saum auf der ciskortikalen Seite bei der gesamten Gruppe derart aus, dass er mindestens 2 mm in den Osteotomiespalt ragte, diesen bei zwei Tieren (Nr.12120, 12130) sogar überbrückte. An transkortikaler Seite zeigte sich Einwachsen von röntgendichtem Gewebe an zwei Tieren (Nr.12133, 12135). Der endostale Bereich des Defektes wurde unterschiedlich stark aufgefüllt. So zeigte sich bei einem Tier (Nr.12122) keine, bei einem anderen (Nr.12135) die vollständige Füllung des Defektes mit kalzifiziertem Gewebe. Hydrogel konnte in keinem Osteotomiespalt angesprochen werden.

4.3.1.5 Autograft

Nach einem Beobachtungszeitraum von 4 Wochen stellten sich radiologisch Veränderungen der Knochendichte um den Osteotomiespalt an 5 Tieren in 7 Lokalisationen dar (ciskortikal: Nr.1276, 12127; transkortikal: Nr.12175, 12176, 12126; endostal: Nr.1276, 12126). Nach 8 Wochen war bei allen Tieren und in allen Lokalisationen eine Veränderung der Knochendichte zu beobachten. Nach einem Beobachtungszeitraum von 12 Wochen zeigte die gesamte Gruppe eine Überbrückung auf ciskortikaler Seite, auf transkortikaler Seite ließ sich dies an zwei Tieren (Nr.1276, 12126) nachweisen. Der Rest der Gruppe zeigte in dieser Lokalisation ein Einwachsen von röntgendichtem Saum in den Osteotomiespalt. Der Defektpalt aller Tiere zeigte nach 12 Wochen eine endostale Auffüllung von röntgendichtem Gewebe von über 50%.

Diagramm 4.1 zeigt den durchschnittlichen Knochenneuformationsgrad der 3 Lokalisationen (Cis-,Transkortex, Endostal)

Dia.4.1: Radiologie: Auswertung der totalen Osteoneogenese nach Zeit, Legende s.S.22



4.3.1.6 Statistischer Vergleich der Radiologie

Für diesen Vergleich wurden die Ergebnisse der 3 verschiedenen Lokalisationen (ciskortikal, transkortikal, endostal) an den jeweiligen Zeitpunkten addiert.

Bei den mit Autograft gefüllten Defekten zeigte sich eine stärkere Veränderung des röntgendichten Gewebes um und im Osteotomiespalt. Dieser Unterschied war im Test nach Scheffe bei 4 Wochen und 8 Wochen signifikant. Nach 12 Wochen zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen dem Autograft und den Emptygruppen ($p=0,02$) und PTH_{low} ($p=0,01$) (Tab. 4.2).

Tab.4.2: Radiologie Fisher's PLSD-Test post hoc-Test nach 4, 8 und 12 Wochen

4 Wochen		Mean Diff.	Std. Error	p Scheffe	p Bonferroni
Empty	Fibrin	0.20	0.452	0.995	1.00
	PTH_{low}	-0.13	0.452	0.999	1.00
	PTH_{high}	0.20	0.452	0.995	1.00
	Autograft	-1.90	0.472	0.013	0.005
Fibrin	PTH_{low}	-0.20	0.431	0.961	1.00
	PTH_{high}	0.00	0.431	1.00	1.00
	Autograft	-2.10	0.452	0.003	0.001
PTH_{low}	PTH_{high}	0.33	0.431	0.961	1.00
	Autograft	-1.77	0.452	0.016	0.007
PTH_{high}	Autograft	-2.10	0.452	0.003	0.001
8 Wochen		Mean Diff.	Std. Error	p Scheffe	p Bonferroni
Empty	Fibrin	-0.48	0.849	0.987	1.00
	PTH_{low}	-0.48	0.849	0.987	1.00
	PTH_{high}	-0.73	0.849	0.943	1.00
	Autograft	-3.70	0.887	0.009	0.004
Fibrin	PTH_{low}	0.00	0.810	1.00	1.00
	PTH_{high}	-0.25	0.810	0.999	1.00
	Autograft	-3.22	0.849	0.021	0.010
PTH_{low}	PTH_{high}	-0.25	0.810	0.999	1.00
	Autograft	-3.22	0.849	0.021	0.010
PTH_{high}	Autograft	-2.97	0.849	0.037	0.037
12 Wochen		Mean Diff	Std. Error	P Scheffe	p Bonferroni
Empty	Fibrin	-1.250	0.9551	0.787	1.00
	PTH_{ow}	0.167	0.9551	1.00	1.00
	PTH_{high}	-0.917	0.9551	0.919	1.00
	Autograft	-3.80	0.9975	0.02	0.009
Fibrin	PTH_{low}	1.417	0.9106	0.663	1.00
	PTH_{high}	0.333	0.9106	0.998	1.00
	Autograft	-2.550	0.9551	0.167	0.137
PTH_{low}	PTH_{high}	-1.083	0.9106	0.839	1.00
	Autograft	-3.967	0.9551	0.01	0.004
PTH_{high}	Autograft	-2.883	0.9551	0.010	0.061

4.4 Histologische Auswertung

4.4.1 Histomorphometrische Auswertung

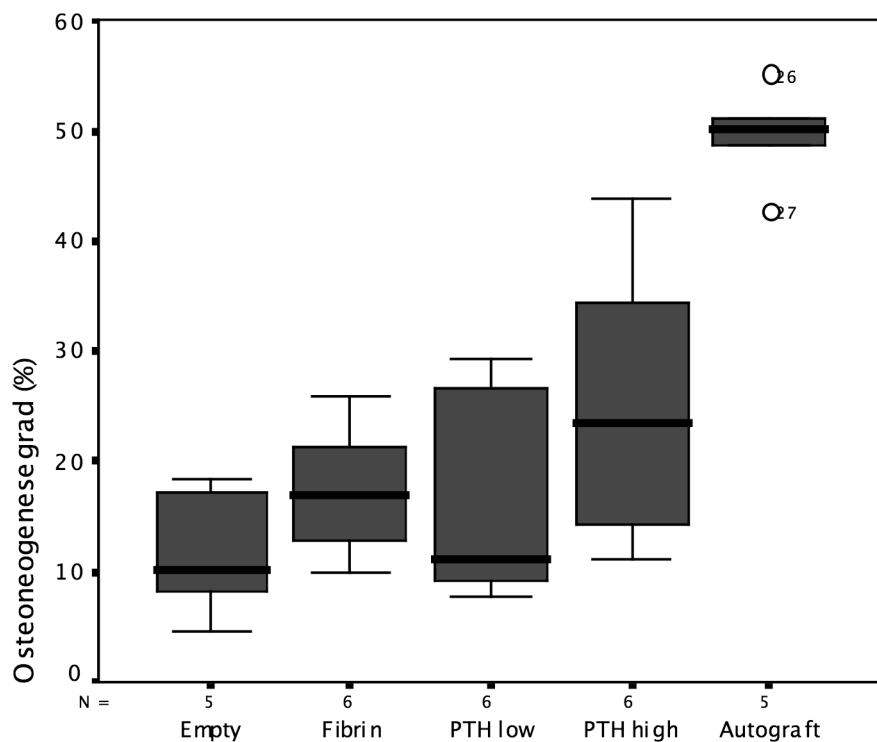
Die genauen Daten der histomorphometrischen Auswertung können Tabelle A.2 entnommen werden. Mittelwerte und Standardabweichungen der Ergebnisse der histomorphometrischen Evaluation sind der Tabelle A.5 zu entnehmen.

Die Menge an neu gebildetem Knochen nahm mit der Konzentrationserhöhung des PTH₁₋₃₄ zu. Jedoch fiel bei Gruppe PTH_{low} und PTH_{high} die hohe Standardabweichung auf. Statistisch signifikant war aber nur die Erhöhung bei der Gruppe der Autografts. Bezüglich der Menge des fibrösen Bindegewebes zeigten sich signifikante Unterschiede bei der Gruppe der Autografts. Die Menge des fibrösen Gewebes und des neu gebildeten Knochens korrelierten negativ miteinander. Bei der Menge des originären Knochens konnten keine signifikanten Unterschiede ausgemacht werden.

Tab.4.3: Histomorphometrie: Fisher's PLSD-Test post hoc-Test der Osteoneogenese und Bindegewebeanteil

Osteoneogenese Histomorphometrie		Mean Diff.	Std.Err.	p Scheffe	p Bonferroni
Empty	Fibrin	-5.60	5.07	0.871	1.00
	PTH _{low}	-4.12	5.07	0.954	1.00
	PTH _{high}	-13.40	5.07	0.174	0.145
	Autograft	-33.66	5.29	0.000	0.000
Fibrin	PTH _{low}	1.48	4.83	0.000	1.00
	PTH _{high}	-7.80	4.83	0.632	1.00
	Autograft	-32.18	5.07	0.000	0.000
	Autograft	-33.60	5.07	0.000	0.000
PTH _{high}	Autograft	-24.38	5.07	0.002	0.001

Bindegewebeanteil		Mean Diff	Std. Err	p Scheffe	p Bonferroni
Empty	Fibrin	1.94	5.69	0.998	1.00
	PTH _{low}	0.70	5.69	1.00	1.00
	PTH _{high}	8.82	5.69	0.665	1.00
	Autograft	37.53	5.94	0.000	0.000
Fibrin	PTH _{low}	-1.24	5.42	1.00	1.00
	PTH _{high}	6.88	5.42	0.805	1.00
	Autograft	35.59	5.69	0.000	0.000
	Autograft	36.83	5.69	0.00	0.000
PTH _{high}	Autograft	28.71	5.69	0.001	0.000

Dia.4.2: Histomorphometrie: Auswertung der Knochenneubildungsfläche

Fläche der Knochenneubildung (%) in Bezug auf Bindegewebe und originäre Matrix

Tab.4.4: Korrelationen der Histomorphometrie nach Pearson (Correlation/p-Wert)

	Neue Matrix	Bindegewebe	Originärer Knochen
Neue Matrix	1.00/-	-0.932/0.000	-0.026/0.896
Bindegewebe	-0.932/0.000	1.00/-	-0.337/0.079

4.4.2 Histologische Auswertung

Die genauen Daten der semiquantitativen Analyse sind der Tabelle A.3 zu entnehmen.

Mittelwerte und Standardabweichungen der Ergebnisse der histologischen Auswertung sind der Tabelle A.6 zu entnehmen.

Leerproben

In der Toluidinfärbung stellten sich knöcherne Strukturen in einem Mittelblau dar. Bei den Leerproben zeigten die Defektgrenzen der Transseite wenig Reaktion. Eine Ausnahme bildete das Schaf Nr.12137/Empty, bei dem es fast zu einer Überbrückung des Defektes in dieser Lokalisation kam. Auch stellte sich eine Osteoidinsel (Abb.4.2), eingebettet in Osteoblasten und Fibrozyten im Defekt, dar. Auf der Cisseite zeigten sich Knochentrabekel mit aktiven Osteoblasten. Typische Entzündungszellen wie Lymphozyten, Plasmazellen und neutrophile Granulozyten waren nur in mäßiger

Anzahl diffus vorhanden. Endothelzellen zeigten, dass eine geringgradige Blutgefäßeinsprossung im Defekt stattgefunden hatte, diese Gefäße waren diffus verteilt. Auch Makrophagen und mononukleäre Zellen waren diffus verteilte Einzelfunde, die sich überwiegend in der defektnahen Spongiosa befanden. Osteoklasten (Abb. 4.3) konnte man vor allem am Ciskortex vermehrt darstellen, im Allgemeinen war die Zahl der Osteoklasten auf ein Mittelmaß beschränkt.

Fibrinproben

Bei den Fibrinproben zeigte sich eine große Varianz in der Aktivität der Osteoblasten. So waren sowohl Fälle (Tier Nr. 12154/Fibrin, 12153/Fibrin) zu beobachten, in denen sich Osteoblasten auf der ciskortikalen Seite hypertrophiert, palisadenartig angeordnet auf der Oberfläche von neu aufgebautem Osteoid zeigten als auch Fälle völliger Inaktivität (Tier Nr.12153/Fibrin) der Osteoblasten der Transseite. Osteoklasten konnten nur vereinzelt, sowohl an den scharf begrenzten kortikalen wie auch an den trabekulären Defektgrenzen, angesprochen werden. Entzündungszellen wie Lymphozyten waren in großer Anzahl, jedoch in diffuser Verteilung vorhanden, Plasmazellen traten vereinzelt auf, neutrophilen Granulozyten wurden keine gefunden. Nach Bonferroni bestand ein signifikanter Unterschied ($p=0,042$) in Bezug auf Entzündungszellen im Vergleich zu der Gruppe der PTH_{high} und der Gruppe der Autografts. Eine starke Blutgefäßeinsprossung war durch eine vermehrte Anzahl an Endothelzellen im Defekt belegbar. Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen traten vereinzelt auf. In den Osteotomiespalten zeigten sich vermehrt Fibrozyten, die Kollagenfasern gebildet hatten, Hydrogelreste waren nicht vorhanden.

PTH_{low}

Bei dieser Gruppe äußerte sich die große Varianz der Osteoblastenaktivität sowohl durch erhöhte Knochenneubildung (Tiere Nr. 12134, 12135) als auch durch das Auftreten von non-unions (Tier Nr. 12122) auf der transkortikalen Seite (Tier Nr. 12135). Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen waren vermehrt und in diffuser Verteilung anzutreffen. Osteoklasten konnten an den scharf begrenzten kortikalen Defektgrenzen angesprochen werden. Zu sehen waren Entzündungszellen wie Lymphozyten und vereinzelt Plasmazellen, was sich auch im statistischen Trend niederschlug ($p=0,056$; Bonferroni). Hydrogelreste waren keine erkennbar.

PTH_{high}

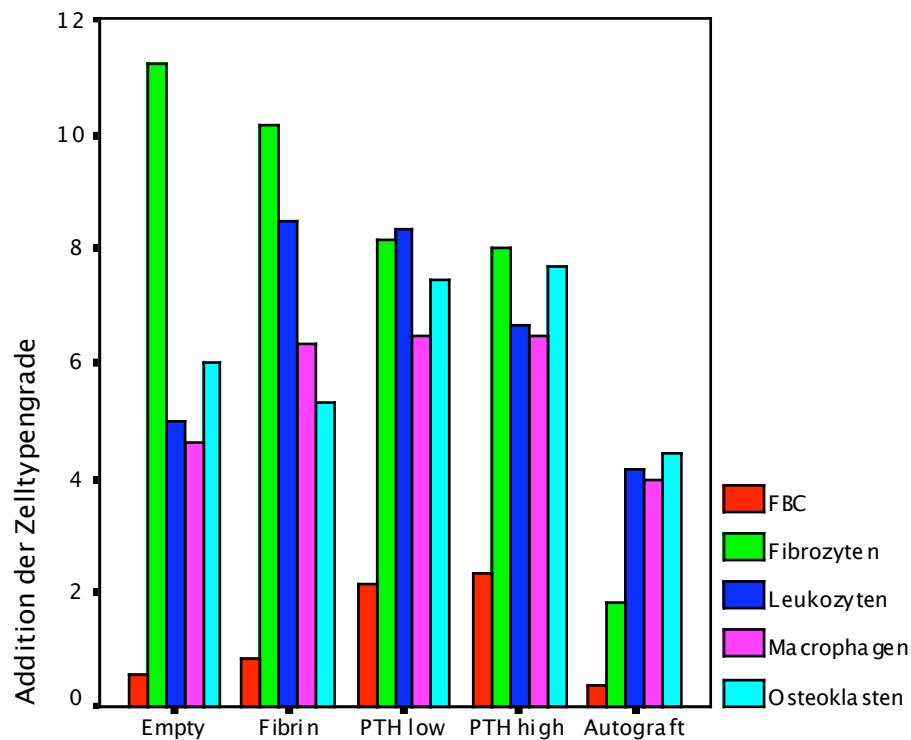
Hier zeigte sich eine vermehrte Aktivität der Osteoblasten (Abb. 4.11), was sich durch Knochenneubildung auf der endostalen Seite äußerte. Die noch nicht mineralisierten Osteoidsäume waren mehrschichtig. Enchondrale Ossifikation (Abb. 4.10) stellte sich in Form größerer Areale dar. Dort zeigten sich Knorpelzellen in Form von „Blasenknorpeln“. Chondroblasten waren in diesen Arealen vermehrt anzutreffen. In Resorptionslakunen zeigte sich vermehrt eine Einsprossung von Endothelzellen, Bindegewebe und Mesenchymzellen.

Entzündungszellen traten vereinzelt diffus auf. In einem Fall (Nr.12129) zeigte sich ein multifokales Auftreten von Lymphozyten im Defekt. Eine Infiltration von Makrophagen, die sich um diese multifokalen Entzündungsherde anreicherten, war in diesem Tier zu verzeichnen. Fremdkörperriesenzellen waren in diffuser Verteilung vermehrt anzutreffen. Auch einsprossende Blutgefäße waren zu sehen. Hydrogelreste waren keine erkennbar. Osteoklasten waren vermehrt an den scharf begrenzten, kortikalen Defektgrenzen zu sehen. Diese waren in Abständen von mindestens 200 µm zueinander anzutreffen. An den trabekulären Defektgrenzen waren vermehrt diffus verteilte Chondroklasten anzutreffen.

Autograft

Die Menge neu gebildeten Geflechtknochens hatte hier hochgradig zugenommen. Es zeigte sich eine erhöhte Aktivität der Osteoblasten, die sich in rundlich hypertrophierter Form darstellten. Herde von enchondraler Ossifikation (Abb. 4.12) konnten in Form kleinerer, zahlreicher multifokaler Areale beobachtet werden. Dort zeigten die hypertrophen Knorpelzellen eine beginnende Mineralisation. Lymphozyten und Plasmazellen waren nur vereinzelt nachzuweisen, auch Makrophagen traten nur spärlich auf. Fremdkörperriesenzellen konnten nicht beobachtet werden. Selten waren Osteoklasten zu sehen, die eher an den Defektgrenzen der Kortikalis angesiedelt waren.

Dia.4.3: Histologie: Vergleich der verschiedenen Zellen im Dünnschnitt. Legende s.S23 (Addition der Zelltypengrade)



4.4.2.1 Statistischer Vergleich der Zelltypen

Bei den Leerdefekten traten mehr Fibrozyten auf. Dieser Unterschied war nach Scheffe ($p=0,029$) signifikant. Signifikant vermehrtes Auftreten von Lymphozyten zeigt sich bei den alleinigen Fibrinproben im Test nach Bonferroni ($p=0,042$). Tendenziell mehr Lymphozyten zeigten sich bei der geringeren PTH_{1-34} -Konzentration (PTH_{low}) ($p=0,056$). Weder bei der Verteilung von Fremdkörperriesenzellen noch bei der Verteilung von Osteoklasten bestanden signifikante Unterschiede.

Tab.4.5: Fisher's PLSD-Test post hoc-Test der Lymphozyten und Fibrozyten

Lymphozyten		Mean Difference	Std. Error	p Scheffe	p Bonferroni
Autograft	Empty	-0.80	1.41	0.988	1.00
	Fibrin	-4.30	1.35	0.069	0.042
	PTH_{low}	-4.13	1.35	0.086	0.056
	PTH_{high}	-2.47	1.35	0.520	0.815
Fibrozyten					
Autograft	Empty	-9.40	2.60	0.029	0.015
	Fibrin	-8.37	2.49	0.049	0.027
	PTH_{low}	-6.37	2.49	0.200	0.177
	PTH_{high}	-6.20	2.49	0.222	0.205

5 Diskussion

5.1 Ziel der Studie

Die vorliegende Arbeit untersuchte die osteostimulierende Wirkung der verzögerten lokalen Freisetzung des Wachstumsmediators PTH₁₋₃₄ aus einem auf Fibrin basierenden Hydrogel in einem segmentalen diaphysären Defekt in einer tierexperimentellen Studie an Schafen. Um eventuelle konzentrationsabhängige Effekte zu erfassen, wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen von PTH₁₋₃₄ angewandt (PTH_{low}; PTH_{high}) und mit Kontrollen verglichen (Autografts, Leerproben, Fibrinfüllung).

5.2 Versuchsmodell

Die Tibia des adulten Schafes hat sich wiederholt als gutes Tiermodell für die Untersuchung von Knochenersatzmaterialien in der Knochenchirurgie erwiesen^{25,31}.

Schafe wurden gewählt, weil sowohl die Proportionen der Knochen als auch die Knochenstruktur dem Menschen sehr ähnlich sind^{26,27}. Schafe sind darüber hinaus relativ kostengünstig und gut domestiziert, was ihrer Betreuung im Projekt sehr entgegenkam. Wie schon in früheren Studien bewährten sich die Aufhängesysteme in Form von Netzen sehr. Die Beobachtungszeiträume von 4, 8 und 12 Wochen wurden gewählt, da die Erfahrungen aus vorangegangenen Studien belegen, dass hiermit die wesentlichen nach der Implantation ablaufenden Vorgängen erfasst werden, auch konnte so an Vorgängerprojekte angeknüpft werden⁶².

5.3 Chirurgisches Vorgehen

Der Zugang zum Tibiaschaft von medial ist ohne aufwendige Präparation und Spezialinstrumentarium möglich, da der Knochen unmittelbar unter der Subcutis zu finden ist. Bezüglich der Größe des Defektes ist festzuhalten, dass als Testmodell ein so genannter „critical size defect“ (Mindestdefektgröße) verwendet werden sollte. In der Literatur finden sich keine Angaben über die zur Schaffung eines „critical size defects“ an der Tibia des Schafes notwendige Mindestgröße. Nach Augat et al. führen am Metatarsus von Schafen schon wenige Millimeter breite Frakturspalten zu einer starken Beeinträchtigung der Knochenheilung⁶⁵. Aus diesen Daten konnte gefolgert werden, dass beim Schaf bei einem Tibiadeфекt mit einem Durchmesser von 10 mm mit hoher Wahrscheinlichkeit keine spontane knöcherne Regeneration zu erwarten ist. Sowohl die Ergebnisse der leer gelassenen Proben, als auch die Ergebnisse vorhergehender Studien

unterstützten diese Annahme^{14,62}. Da bekanntermaßen das Periost des Röhrenknochens eine große Rolle bei der knöchernen Regeneration spielt⁶⁶⁻⁶⁸, wurde dieses bei jedem Defekt sorgfältig entfernt, um eine standardisierte Ausgangsposition der Heilung zu erreichen.

Die Handhabung des auf Fibrin basierenden Hydrogels unter intraoperativen Bedingungen erwies sich als problemlos. Durch die Applikation mittels einer Spritze konnten die Defekte ohne Komplikationen befüllt werden. So wurde durch die vollständige Defektfüllung ein direkter Kontakt des Hydrogels zu den knöchernen Defektgrenzen sichergestellt. Bei 27 Tieren verlief die unilaterale Operation problemlos. Bei einem Tier brach der Gewindeschneider ca. 1 cm distal des Osteotomiespaltes ab und wurde in der Markhöhle belassen. Damit einhergehende negative Auswirkungen auf die Defektheilung konnten nicht festgestellt werden. Besondere Erwähnung muss hier der Gebrauch der LC-DCP finden. In einer vorangegangenen Studie an unserem Institut zeigten sich bei gleicher Operationstechnik, jedoch unter Verwendung einer DCP, Komplikationsraten bei 9/42 Schafen durch Plattenbiegung oder -bruch⁶². Durch den Gebrauch der LC-DCP, die eine 10fach höhere Belastung tragen kann, wurde diese Komplikation vollständig vermieden.

5.4 Probenaufbereitung und Auswertung

Die die Osteotomie enthaltenden Knochenstücke wurden mithilfe einer Bandsäge aus der Tibia herausgetrennt. Mit diesem Vorgehen konnte der Defekt mitsamt dem umgebenden Knochen bei allen Schafen unversehrt gewonnen werden. In wenigen Fällen kam es vor, dass der Rand des Defektes schwer zu erkennen war und der Sägeschnitt nur noch einen sehr schmalen Bereich angrenzenden Knochens stehen ließ. Die weitere Auswertung wurde dadurch aber kaum beeinträchtigt, da der Defektspace bei der histologischen Evaluation dementsprechend berücksichtigt wurde.

5.5 Radiologische Auswertung

Das postoperative Röntgen der operierten Gliedmaße am noch narkotisierten Tier hat sich wie erwartet bewährt, um den Operationserfolg zeitnah zu überprüfen. Die LC-DCP und die Osteotomie waren in korrekter Lokalisation darstellbar.

Die Evaluierung und Interpretation der Röntgenbilder ab 4 Wochen nach der Operation zur Erfassung von Anzeichen einer Knochenheilung stellte eine große Herausforderung dar. Die radiologische Untersuchung nach 4 und 8 Wochen musste am stehenden Tier

durch den Scotchverband vollzogen werden. Um Röntgenbilder ohne den Castverband erstellen zu können, hätte man die Tiere anästhesieren müssen. Ohne Castverband hätte beim wachen Tier leicht eine Destabilisierung der Osteotomie durch Scher- oder Torsionskräfte eintreten können, die entweder durch Ausrutschen oder Abwehrbewegungen entstehen hätten können. Für die Kontrollröntgen jedes Mal eine Anästhesie durchzuführen, wurde für die Tiere als zu belastend erachtet. Die Osteotomiestellen wurden auf den Röntgenbildern durch das polymere Material des Castverbandes überlagert, was eine uneingeschränkte Beurteilung des Osteotomiespaltes manchmal erschwerte. Auch traf der Röntgenstrahl nicht immer parallel zur Schnittführung der Osteotomie auf den Knochenschaft, so dass sich die proximalen oder distalen, trans- oder ciskortikalen Seiten der Osteotomie in einigen Röntgenbildern (n=10/224) überlagerten.

Im Gegensatz zu einer vorangegangenen Studie, in der Knochenwachstum vor allem auf der Transseite⁶² erzielt wurde, machte sich das Knochenwachstum in dieser Studie auf der ciskortikalen Seite bemerkbar, wenn auch nicht signifikant. Dies könnte auf den Wechsel von DCP auf LC-DCP zurückzuführen sein, da bei dieser Platte die Fläche des Knochenkontaktes gegenüber der DCP um 50 % reduziert wurde und somit die Blutzufuhr der Kortikalis direkt unter der Platte weniger beeinträchtigt wurde^{69,70}. Wird jedoch das Knochenwachstum unabhängig von der Kortexseite betrachtet, konnte - radiologisch betrachtet - keine Gruppe mit Hydrogel die positiven Resultate der Autografts erreichen. Die Degradierbarkeit des Hydrogels war radiologisch nicht nachvollziehbar, da die Substanz durchlässig für Röntgenstrahlen war.

5.6 Histomorphometrische Auswertung

Da es sich bei dieser Auswertung um eine rein quantitative Auswertung handelt, widerspiegelt sie objektiv die Knochenneubildung und Ausprägung von fibrösem Gewebe. Die Menge an neu gebildetem Knochen schien mit der Konzentrationserhöhung des PTH₁₋₃₄ zuzunehmen. Jedoch fiel bei den Gruppen mit PTH₁₋₃₄ die relativ hohe Standardabweichung auf. Statistisch signifikant war lediglich die Knochenneubildungsrate bei der Gruppe der Autografts. Die Gründe für die hohe Varianz der Knochenneubildung der PTH₁₋₃₄-Gruppen sind zu diesem Zeitpunkt unbekannt, die unterschiedliche Heilungstendenz des Individuums an sich oder auch die Lokalisation des Defektes (ob proximaler oder distaler) und die damit verbundene Blutversorgung kann eine Rolle spielen. Nicht zuletzt kann es bei der Defektsetzung

zum Heraustrennen eines etwas keilförmigen Knochenstückes kommen, da das Messinstrument nur von medial angesetzt werden kann. Dies könnte vor allem bei der Berechnung der Werte für den originären Knochen (alte Knochenmatrix) zu höheren Werten auf der Seite geführt haben, wo der schmalere Teil entfernt wurde. Das fiel dann vornehmlich bei der Berechnung der Leerproben ins Gewicht. Nach einer Fraktur bzw. Osteotomie wird als erstes die alte Knochenmatrix in der Nähe der Läsion als Antwort auf das Trauma resorbiert und erst nach dem Debridement, welches mit einer physiologischen Entzündung einhergeht, wird neuer Knochen aufgebaut. Die Resorption kann in unserem Falle nicht gemessen werden, da keine Ausgangswerte der alten Knochenmatrix post operationem in Prozentzahlen gemessen werden konnten. Darüber kann lediglich die Evaluation der zellulären Antwort, in diesem Falle vor allem der Vergleich von Osteoklasten zwischen den verschiedenen Gruppen Aufschluss geben. Die gesteigerte anabole Wirkung auf trabekulären Knochen bei gleichzeitiger kataboler Wirkung auf kortikalen Knochen unter PTH₁₋₃₄-Wirkung konnte in dieser Studie nicht beobachtet werden⁷¹. Jedoch wurde die anabole Wirkung von niedrigen Konzentrationen sowohl auf trabekulären als auch kortikalen Knochen gezeigt. Die Konzentrationsabhängigkeit des Knochenwachstums von PTH₁₋₃₄ konnte durch die zwei unterschiedlichen, wenn auch niedrigen, Konzentrationen unter Beweis gestellt werden. Ob bei höheren Konzentrationen von PTH eine Resorption oder eine zu hohe Knochenneubildung in Form von heterotopen Ossifikationen von Weichteilgewebe ähnlich dem BMP (bone morphogenetic protein) oder unerwünschter Knochenexostosenbildung stattfindet, müsste durch weitere Untersuchungen noch geprüft werden. Aufgrund der bekannten physiologischen Wirkung von systemischem PTH wäre wohl eher eine Resorption zu erwarten, wobei der sogenannte „Cut-off-Point“ bzw. die Umkehr der anabolen zur katabolen Wirkung bei lokaler Anwendung zuerst noch gefunden werden müsste. Dieser Punkt dürfte nicht nur von der Konzentration alleine, sondern auch von der Art der Bindung und Freisetzung des PTH₁₋₃₄ aus dem Hydrogel abhängen. Zukünftige und in unserer Gruppe bereits laufende Studien werden diese Punkte klären.

5.7 Histologische Auswertung

Das Hydrogel war nach 3 Monaten vollständig resorbiert. Dies deckt sich mit den Resultaten zur schnellen Resorbierbarkeit eines Hydrogels auf Fibrinbasis in unserer vorhergehenden Studie in einem „Bohrloch“-Modell⁶⁰. Enchondrale Ossifikation zeigte nur die Gruppe PTH_{high} und die des Autografts. Die enchondrale Ossifikation der Diaphyse eines Röhrenknochens beginnt mit der charakteristischen Umwandlung der Knorpelzellen zum „Blasenknorpel“, es wird die sogenannte Primärspongiosa gebildet. Mit Hilfe von Chondroklasten mesenchymaler Herkunft wird der verkalkte Säulenknorpel abgebaut. Es entstehen primäre Markräume, in die Gefäße, Bindegewebe und Mesenchymzellen einwachsen und damit den Knorpel vaskularisieren. Die Mesenchymzellen differenzieren zu Osteoblasten, welche die Lakunen ausfüllen und Osteoid bilden. Dieser Vorgang lässt, zusammen mit der Hypertrophierung der Osteoblasten, auf die Art der Knochenneubildung schließen. Knochenneubildung zeigte sich, abgesehen von der Gruppe der Autografts, sowohl in der Fibringruppe als auch in der PTH_{high}-Gruppe recht deutlich. Lymphozyten und Plasmazellen befanden sich vor allem in den Hydrogelgruppen ohne oder mit wenig PTH₁₋₃₄. Die Ansammlung dieser Entzündungszellen in Tieren der Gruppe ohne PTH₁₋₃₄ lassen auf eine Abwehr des Immunsystems oder zumindest eine Entzündungsreaktion schließen. Eine derartige Reaktion auf Fibrinkleber wurde bereits in der Literatur beschrieben. So zeigte sich eine vermehrte Infiltration mit Entzündungszellen in der Mukosa der Maulhöhle von Katzen, nach Applikation eines Mukosagrafts mittels Fibrinkleber⁷². Auch im bereits beschriebenen „Bohrlochmodell“ war eine Entzündungsreaktion mononuklearer Zellen auf diesen Träger zu beobachten. In der vorliegenden Studie konnte eine Reduzierung von Lymphozyten und Plasmazellen durch die Erhöhung der PTH₁₋₃₄-Konzentration erzielt werden. Dieses Phänomen wurde kürzlich bereits beschrieben. Durch die PTH-vermittelte Osteoklastogenese konnte dem inflammatorisch induzierten Knochenverlust entgegengewirkt werden⁷³. Das könnte auf eine modulierende Wirkung des PTH auf Entzündungsprozesse, zumindest beim lokalen Gebrauch des Peptides, schließen lassen. Der Mechanismus dieser antiinflammatorischen Wirkung beruht auf der Induktion von IGF-1 durch PTH^{13,14,74}. Sowohl die entzündungshemmende als auch die osteoblastenproliferierende Wirkung von IGF-1 wurde sowohl in vitro und in vivo gezeigt^{13,14,75,76}. Sie wirkt via NF-κB, einem wichtigen Transkriptionsfaktor, der in praktisch allen Zelltypen und Geweben vorkommt.^{77,78}

Degradierbare Materialien werden im Körper vornehmlich durch Makrophagen abgebaut. Je nach Menge des anfallenden Materials wird ihre Fusion zu Fremdkörperriesenzellen begünstigt, wodurch noch effizienter abgebaut und verdaut werden kann. Diese Fremdkörperriesenzellen traten nur vereinzelt auf. Sie waren stets alleine, d.h. ohne eine große Ansammlung von weiteren Entzündungszellen wie Lymphozyten und Plasmazellen, anzutreffen. Dies spricht gegen eine Fremdkörperreaktion, welche die Biokompatibilität des Materials in Frage stellen würde, und kann somit als Maß für die Degradierbarkeit des Materials gesehen werden. Das Hydrogel wurde sehr schnell innerhalb von 3 Monaten vollständig degradiert. Fraglich bleibt, ob Entzündungszellen wie Lymphozyten die Knochenheilung begünstigen⁷⁹⁻⁸¹ oder hemmen⁸². Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie geht hervor, dass der Knochen trotz der Lymphozyten und Plasmazellen in der PTH₁₋₃₄-freien Gruppe gut in das Hydrogel einwachsen konnte, dieses schnell resorbiert und die Knochenneubildung angeregt wurde. Trotz alledem sollte man die Ätiologie dieses Entzündungsgeschehens untersuchen. Die Anwesenheit von Fibrozyten, einsprossenden Gefäßen, Lymphozyten und vor allem Plasmazellen deuten auf eine leichte, chronische Entzündung hin. Dies bedeutet, dass der Körper wahrscheinlich auf das fibrine Hydrogel reagiert hat. Ursache dafür könnte der xenogene Ursprung des Fibrins sein. Durch weitere Modifikation, beispielsweise durch Erhöhen der PTH₁₋₃₄-Konzentration mit seiner damit offenbar im Knochen verbundenen antiinflammatorischen Wirkung oder den Einsatz von Schaffibrin sollte die richtige Zusammensetzung gefunden werden.

Das Auftreten von Osteoklasten schien nicht dosisabhängig zu sein, auch überstieg der Mittelwert der Histologiescores in keiner Gruppe und bei keinem Tier den Wert von 1,5; d.h. im Durchschnitt waren weniger als insgesamt 10 Zellen pro Mikroskop-Gesichtsfeld zu zählen. Dies besagt, dass die erhobenen Werte sich im Rahmen einer normalen Reaktion auf die Fraktur bewegen und somit kein Indiz für eine osteoklasteninduzierte Resorption des Knochens sind. Eine osteoklasteninduzierte Resorption des Knochens zeigte sich allerdings bei hohen Konzentrationen (5 und 10 mg/ml) von PTH⁶². Das unterstützt die Hypothese, dass bei hoher PTH-Anwendung Knochenresorption forciert wird^{54,83}, jedoch bei geringen Konzentrationen (bis 2 mg/ml) die Proliferation von Osteoblastenvorläuferzellen angeregt⁶² und so das Knochenwachstum verstärkt wird.

5.8 Gesamturteil

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die lokale Abgabe von PTH₁₋₃₄ aus Fibrinhydrogel sicher und machbar ist und die Kombination von Fibrinhydrogel mit PTH₁₋₃₄ die entzündliche Reaktion von Fibrinhydrogel dämpft. Weitere Studien mit höheren PTH₁₋₃₄-Konzentrationen sind notwendig, um geeignete PTH₁₋₃₄-Konzentrationen zu finden, die bei der Knochendefektheilung ähnlich effektiv die Knochenneubildung stimulieren wie autologe Knochenspongiosa.

5.9 Perspektiven

Die lokale Anwendung des Parathormons zur Anregung der Knochenneubildung scheint ein vielversprechendes Modell für die Zukunft der Osteosynthese zu sein. Noch sind weitere Modifizierungen in Bezug auf Trägersubstanz, PTH₁₋₃₄-Konzentration und die Art und Weise der Bindung des PTH-Peptides an die Trägersubstanz durchzuführen, um dieselben Resultate wie die eines Autografts zu erreichen. So führte die lokale Anwendung von dem in der vorliegende Studie untersuchten Hydrogel mit einer PTH₁₋₃₄-Konzentration von 0,4 mg/ml zu einer komplikationslosen Heilung einer subchondralen Knochenzyste bei einem Fohlen⁶¹.

Der weitere klinische Einsatz dieses strukturarmen Gels an mechanisch stark beanspruchten Gebieten ist wahrscheinlich nur mit Hilfe von konventionellen Osteosynthese-Maßnahmen zu bewerkstelligen. Auch die Zugabe von TCP-Granula führte bei einer PTH₁₋₃₄-Konzentration von 0,4 mg/ml zu sehr guten Ergebnissen⁶². Bevor das vorliegende Hydrogel zu weiteren klinischen Einsätzen kommt, muss das Präparat in seiner biologischen Verträglichkeit verbessert werden, die systemischen Nebenwirkungen müssen abgeklärt werden und die geeignete PTH₁₋₃₄-Konzentration muss in weiteren Tierversuchen eruiert werden.

6 Literaturverzeichnis

- 1.Aaboe M, Pinholt EM, Hjorting-Hansen E: Healing of experimentally created defects: a review. *Br J Oral Maxillofac Surg* 33:312-318, 1995
- 2.Service RF: Tissue engineers build new bone. *Science* 2000; 289:1498-500, 2000
- 3.Rueger JM: [Bone substitutes. State of the art and: what lies ahead?]. *Unfallchirurg* 99:228-236, 1996
- 4.Biddulph SL: Bone donor site. Iliac crest or distal radius? *J Hand Surg [Br]* 24:645-646, 1999
- 5.Kurz LT, Garfin SR, Booth RE, Jr.: Harvesting autogenous iliac bone grafts. A review of complications and techniques. *Spine* 14:1324-1331, 1989
- 6.Damien CJ, Parsons JR: Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater* 2:187-208, 1991
- 7.Gerngross H, Burri C, Kinzl L, et al: [Complications at removal sites of autologous cancellous bone transplants]. *Aktuelle Traumatol* 12:146-152, 1982
- 8.Kuboschke KGKKG: Bedeutung von Protein-Wachstumsfaktoren für die lokale Regulation des Knochenwachstums. *Dtsch Med Wschr*, 1990. 115: S. 1921-1926. 1990
- 9.Kubler Kb: Osteoinduktion und -reparation. *Mund Kiefer GesichtsChir*, 1997. 1: S. 2-25. 1997
- 10.Rueger JM: [Bone substitution materials. Current status and prospects]. *Orthopaede* 27:72-79, 1998
- 11.Aabendroth KA, K: Der Osteoblast: Funktion und hormonelle Regulation, in *Aktuelle Aspekte der Osteologie (A: Übersichtsreferate)*, Ittel, T. H., Sieberth, H.-G., und Matthiaß, H.H., Editors. 1992, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. S. 10-17. 1992
- 12.Kibblewhite DJ, Bruce AG, Strong DM, et al: Transforming growth factor-beta accelerates osteoinduction in a craniofacial onlay model. *Growth Factors* 9:185-193, 1993
- 13.Meinel L, Illi OE, Zapf J, et al: Stabilizing insulin-like growth factor-I in poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *J Control Release* 70:193-202, 2001
- 14.Meinel L, Zoidis E, Zapf J, et al: Localized insulin-like growth factor I delivery to enhance new bone formation. *Bone* 33:660-672, 2003
- 15.Weber FE, Eyrich G, Gratz KW, et al: Slow and continuous application of human recombinant bone morphogenetic protein via biodegradable poly(lactide-co-glycolide) foamspheres. *Int J Oral Maxillofac Surg* 31:60-65, 2002
- 16.Rutherford RB, Moalli M, Franceschi RT, et al: Bone morphogenetic protein-transduced human fibroblasts convert to osteoblasts and form bone in vivo. *Tissue Eng* 8:441-452, 2002
- 17.Schmoekel H, Schense JC, Weber FE, et al: Bone healing in the rat and dog with nonglycosylated BMP-2 demonstrating low solubility in fibrin matrices. *J Orthop Res* 22:376-381, 2004
- 18.Schmoekel HG, Weber FE, Hurter K, et al: Enhancement of bone healing using non-glycosylated rhBMP-2 released from a fibrin matrix in dogs and cats. *J Small Anim Pract* 46:17-21, 2005
- 19.Schmoekel HG, Weber FE, Schense JC, et al: Bone repair with a form of BMP-2 engineered for incorporation into fibrin cell ingrowth matrices. *Biotechnol Bioeng* 89:253-262, 2005
- 20.Suzuki Y, Tanihara M, Suzuki K, et al: Alginate hydrogel linked with synthetic oligopeptide derived from BMP-2 allows ectopic osteoinduction in vivo. *J Biomed Mater Res* 50:405-409, 2000

21. Sheller MR, Crowther RS, Kinney JH, et al: Repair of rabbit segmental defects with the thrombin peptide, TP508. *J Orthop Res* 22:1094-1099, 2004
22. Fang J, Zhu YY, Smiley E, et al: Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5753-5758, 1996
23. Kirker-Head CA, Gerhart TN, Armstrong R, et al: Healing bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2 and copolymer. *Clin Orthop Relat Res*:205-217, 1998
24. Simmons CA, Alsberg E, Hsiong S, et al: Dual growth factor delivery and controlled scaffold degradation enhance in vivo bone formation by transplanted bone marrow stromal cells. *Bone* 35:562-569, 2004
25. Lanyon LE, Hampson WG, Goodship AE, et al: Bone deformation recorded in vivo from strain gauges attached to the human tibial shaft. *Acta Orthop Scand* 46:256-268, 1975
26. Finlay JB, Hurtig MB, Hardie WR, et al: Geometrical properties of the ovine tibia: a suitable animal model to study the pin-bone interface in fracture fixation? *Proc Inst Mech Eng [H]* 209:37-50, 1995
27. Nunamaker DM: Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*:S56-65, 1998
28. Eitel F, Klapp F, Jacobson W, et al: Bone regeneration in animals and in man. A contribution to understanding the relative value of animal experiments to human pathophysiology. *Arch Orthop Trauma Surg* 99:59-64, 1981
29. Metak G, Gomoll A, Wolter W, et al: [Interspecies comparison of healing standardized bone defects with and without autogenous bone transplantation]. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 115:25-30, 1998
30. Aerssens J, Boonen S, Lowet G, et al: Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* 139:663-670, 1998
31. Sturmer KM, Schuchardt W: [New aspects of closed intramedullary nailing and marrow cavity reaming in animal experiments. I. The tibia of the sheep, as a model for intramedullary nailing (author's transl)]. *Unfallheilkunde* 83:341-345, 1980
32. Roach HI, Shearer JR, Archer C: The choice of an experimental model. A guide for research workers. *J Bone Joint Surg Br* 71:549-553, 1989
33. Williams D: Revisiting the definition of biocompatibility. *Med Device Technol* 14:10-13, 2003
34. Ignatius AA, Claes LE: In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers: poly(L, DL-lactide) and poly(L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials* 17:831-839, 1996
35. Gunther KP, Scharf HP, Pesch HJ, et al: [Integration properties of bone substitute materials. Experimental studies on animals]. *Orthopaede* 27:105-117, 1998
36. Moore WR, Graves SE, Bain GI: Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg* 71:354-361, 2001
37. Foitzik CFC: Knochenersatz- und Knochenaufbaumaterialien in der Implantologie und bei der Behandlung von Knochendefekten, in *Restitutio ad integrum - Vom Knochenersatz zum Knochenaufbau*, Heinenberg, B.-J., Editor. 2000, Spitta Verlag, Balingen. S. 16, 2000
38. Bauer TW, Muschler GF: Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res*:10-27, 2000
39. Phemister DB: Ossification in Kidney Stones Attached to the Renal Pelvis. *Ann Surg* 78:239-249, 1923
40. Lutolf MP, Lauer-Fields JL, Schmoekel HG, et al: Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell-invasion characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5413-5418, 2003

- 41.Schmoekel HG, Weber FE, Seiler G, et al: Treatment of nonunions with nonglycosylated recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered from a fibrin matrix. *Vet Surg* 33:112-118, 2004
- 42.Cheng PT, Chan C, Muller K: Cyclical treatment of osteopenic ovariectomized adult rats with PTH(1-34) and pamidronate. *J Bone Miner Res* 10:119-126, 1995
- 43.Andersson N, Surve VV, Lehto-Axtelius D, et al: Drug-induced prevention of gastrectomy- and ovariectomy-induced osteopaenia in the young female rat. *J Endocrinol* 175:695-703, 2002
- 44.Burr DB, Hirano T, Turner CH, et al: Intermittently administered human parathyroid hormone(1-34) treatment increases intracortical bone turnover and porosity without reducing bone strength in the humerus of ovariectomized cynomolgus monkeys. *J Bone Miner Res* 16:157-165, 2001
- 45.Ejersted C, Andreassen TT, Hauge EM, et al: Parathyroid hormone (1-34) increases vertebral bone mass, compressive strength, and quality in old rats. *Bone* 17:507-511, 1995
- 46.Zhou H, Iida-Klein A, Lu SS, et al: Anabolic action of parathyroid hormone on cortical and cancellous bone differs between axial and appendicular skeletal sites in mice. *Bone* 32:513-520, 2003
- 47.Whitfield J, Morley P, Willick G: The parathyroid hormone, its fragments and analogues--potent bone-builders for treating osteoporosis. *Expert Opin Investig Drugs* 9:1293-1315, 2000
- 48.Whitfield JF, Morley P, Willick GE: The parathyroid hormones: bone-forming agents for treatment of osteoporosis. *Medscape Womens Health* 5:E5, 2000
- 49.Barazza A, Wittelsberger A, Fiori N, et al: Bioactive N-terminal undecapeptides derived from parathyroid hormone: the role of alpha-helicity. *J Pept Res* 65:23-35, 2005
- 50.Schievano E, Mammi S, Carretta E, et al: Conformational and biological characterization of human parathyroid hormone hPTH(1-34) analogues containing beta-amino acid residues in positions 17-19. *Biopolymers* 70:534-547, 2003
- 51.Morley P, Whitfield JF, Willick GE: Design and applications of parathyroid hormone analogues. *Curr Med Chem* 6:1095-1106, 1999
- 52.Wittelsberger A, Corich M, Thomas BE, et al: The mid-region of parathyroid hormone (1-34) serves as a functional docking domain in receptor activation. *Biochemistry* 45:2027-2034, 2006
- 53.Oxlund H, Ejersted C, Andreassen TT, et al: Parathyroid hormone (1-34) and (1-84) stimulate cortical bone formation both from periosteum and endosteum. *Calcif Tissue Int* 53:394-399, 1993
- 54.Miyakoshi N: Effects of parathyroid hormone on cancellous bone mass and structure in osteoporosis. *Curr Pharm Des* 10:2615-2627, 2004
- 55.Riggs BL, Melton LJ, 3rd: The worldwide problem of osteoporosis: insights afforded by epidemiology. *Bone* 17:505S-511S, 1995
- 56.Dempster DW, Cosman F, Kurland ES, et al: Effects of daily treatment with parathyroid hormone on bone microarchitecture and turnover in patients with osteoporosis: a paired biopsy study. *J Bone Miner Res* 16:1846-1853, 2001
- 57.Kasukawa Y, Miyakoshi N, Itoi E, et al: Effects of h-PTH on cancellous bone mass, connectivity, and bone strength in ovariectomized rats with and without sciatic-neurectomy. *J Orthop Res* 22:457-464, 2004
- 58.Lindsay R, Zhou H, Cosman F, et al: Effects of a One-Month Treatment With PTH(1-34) on Bone Formation on Cancellous, Endocortical, and Periosteal Surfaces of the Human Ilium. *J Bone Miner Res* 22:495-502, 2007

- 59.Scheidt KvS: Kurze und mittelfristige Effekte der intermittierenden Applikation von humanen PTH auf den Kalzium-, Phosphor und Knochenstoffwechsel beim Pferd, Universität Hannover, 2004
- 60.Kemper K: Screeningversuch zur Optimierung synthetischer und fibriner Hydrogele als dreidimensionale Trägersubstanz für Bone Morphogenetic Protein, Transforming Growth Factor Beta und Parathormon zur Beschleunigung der Knochenheilung, Musculoskeletal Research Unit, Equine Hospital, Zürich, 2003
- 61.Fuerst A, Derungs S, von Rechenberg B, et al: Use of a parathyroid hormone peptide (PTH(1-34))-enriched fibrin hydrogel for the treatment of a subchondral cystic lesion in the proximal interphalangeal joint of a warmblood filly. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 54:107-112, 2007
- 62.Andrianaly NH: The local application of parathyroid hormone (PTH 1-34) in combination with hydrogel and TCP granules for enhancement of bone healing in an experimental, diaphyseal critical size defect of the tibia in sheep. paper submitted
- 63.Schense JC, Hubbell JA: Cross-linking exogenous bifunctional peptides into fibrin gels with factor XIIIa. *Bioconjug Chem* 10:75-81, 1999
- 64.Klein K: In vivo Studie verschiedener Hydrogele mit variabler Porenstruktur im Vergleich, Musculoskeletal Research Unit. Zürich, Vetsuisse, pp 24, Abb 23.21, 2008
- 65.Augat P, Ryaby JT: Fracture healing and micro architecture. *Adv Exp Med Biol* 496:99-110, 2001
- 66.Macnab I, De Haas WG: The role of periosteal blood supply in the healing of fractures of the tibia. *Clin Orthop Relat Res*:27-33, 1974
- 67.Wallace AL, Draper ER, Strachan RK, et al: The effect of devascularisation upon early bone healing in dynamic external fixation. *J Bone Joint Surg Br* 73:819-825, 1991
- 68.Nather A, Balasubramaniam P, Bose K: Healing of non-vascularised diaphyseal bone transplants. An experimental study. *J Bone Joint Surg Br* 72:830-834, 1990
- 69.Perren SM: The concept of biological plating using the limited contact-dynamic compression plate (LC-DCP). Scientific background, design and application. *Injury* 22 Suppl 1:1-41, 1991
- 70.Perren SM: [Biomechanical reaction of the bones to intra- and extramedullary load bearers: the significance of implant contact]. *Orthopade* 24:402-408, 1995
- 71.Horwitz M, Stewart A, Greenspan SL: Sequential parathyroid hormone/alendronate therapy for osteoporosis--robbing Peter to pay Paul? *J Clin Endocrinol Metab* 85:2127-2128, 2000
- 72.Gaboriau HP, Belafsky PC, Pahlavan N, et al: Closure of mucosal defects over exposed mandibular plates using fibrin glue. *Arch Facial Plast Surg* 1:191-194, 1999
- 73.Romas E, Gillespie MT: Inflammation-induced bone loss: can it be prevented? *Rheum Dis Clin North Am* 32:759-773, 2006
- 74.Canalis E, Centrella M, Burch W, et al: Insulin-like growth factor I mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures. *J Clin Invest* 83:60-65, 1989
- 75.Ernst M, Froesch ER: Growth hormone dependent stimulation of osteoblast-like cells in serum-free cultures via local synthesis of insulin-like growth factor I. *Biochem Biophys Res Commun* 151:142-147, 1988
- 76.Lind M, Deleuran B, Thestrup-Pedersen K, et al: Chemotaxis of human osteoblasts. Effects of osteotropic growth factors. *Apmis* 103:140-146, 1995
- 77.Balaram SK, Agrawal DK, Edwards JD: Insulin like growth factor-1 activates nuclear factor-kappaB and increases transcription of the intercellular adhesion molecule-1 gene in endothelial cells. *Cardiovasc Surg* 7:91-97, 1999

-
78. Heck S, Lezoualc'h F, Engert S, et al: Insulin-like growth factor-1-mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with activation of nuclear factor kappaB. *J Biol Chem* 274:9828-9835, 1999
 79. Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, et al: The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res* 10:1272-1281, 1995
 80. Mahy PR, Urist MR: Experimental heterotopic bone formation induced by bone morphogenetic protein and recombinant human interleukin-1B. *Clin Orthop Relat Res*:236-244, 1988
 81. Santavirta S, Konttinen YT, Nordstrom D, et al: Immunologic studies of nonunited fractures. *Acta Orthop Scand* 63:579-586, 1992
 82. Sampath TK, Reddi AH: Homology of bone-inductive proteins from human, monkey, bovine, and rat extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:6591-6595, 1983
 83. Soma S, Iwamoto M, Higuchi Y, et al: Effects of continuous infusion of PTH on experimental tooth movement in rats. *J Bone Miner Res* 14:546-554, 1999

7 Abkürzungsverzeichnis

LC-DCP	Low Contact Dynamic Compression Plate
PTH	Parathormon
KEM	Knochenersatzmaterial
GH	Growth Hormone
TGF β	Transforming Growth Factor β
IGF-I	Insulin like Growth Factor-I
BMP	Bone Morphogenetic Protein
HA	Hydroxyapatit
PEG	Polyethylenglykol
BDGF	Bone-derived Growth Factor
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
SGF	Skeletal Growth Factor
EGF	Epidermic Growth Factor
ECGF	Endothelial Cell Growth Factor
OIF	Ostoinductive factor
TCP	Trikalziumphosphat
i.m.	intramuskulär
I.U.	Internationale Einheiten
i.v.	intravenös
s.c.	subkutan
MMA	Methylmethacrylat

8 Anhang

8.1 Tabellen

Tab. A.1: Ergebnisse der Radiologie

	Cis 4w	Cis 8 w	Cis 12w	Trans 4w	Trans 8w	Trans 12w	End 4w	End 8w	End 12w	Total 4w	Total 8w	Total 12w
Empty_12117	0	0	2	0	0	0	0	0	0.5	0	0	2.5
Empty_12119	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5	0	0.5	0.5
Empty_12124	0	2	2	0	0	0	0	0	1	0	2	3
Empty_12125	0	2	2	1	2	2	0	0.5	1	1	4.5	5
Empty_12137	0		0	0	0	2	0	1	2	0	1	4
Fibrin_12150	0	0	3	0	0	0	0	2	2	0	2	5
Fibrin_12151	0	1	1	0	0	0	0	0.5	1	0	1.5	2
Fibrin_12152	0	2	2	0	0	0	0	1	1.5	0	3	3.5
Fibrin_12153	0	2	2	0	0	1.5	0	0	2	0	2	5.5
Fibrin_12154	0	2	2.5	0	0	2.5	0	1	2	0	3	7
Fibrin_12155	0	0	2.5	0	0	0	0	1	0	0	1	2.5
PTH _{low} _12122	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
PTH _{low} _12123	0		2	0	0	0	0	1.5	1	0	1.5	3
PTH _{low} _12133	0	1	2	0	1	1	0	0	0.5	0	2	3.5
PTH _{low} _12134	0	1	2	0	0	0	1	1.5	2	1	2.5	4
PTH _{low} _12135	0	0	0	0	2	0.5	1	2	2.5	1	4	3
PTH _{low} _12136	0	1.5	2	0	0	0	0	0	0.5	0	1.5	2.5
PTH _{high} _12120	0	2	2.5	0	0	0	0	0	1	0	2	3.5
PTH _{high} _12121	0	1.5	2	0	0	0	0	0	0.5	0	1.5	2.5
PTH _{high} _12129	0	2	2	0	0	0	0	0	1	0	2	3
PTH _{high} _12130	0	2	3	0	2	2	0	2	2.5	0	6	7.5
PTH _{high} _12131	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
PTH _{high} _12132	0	2	2	0	0	2	0	0.5	1	0	2.5	5
Autograft_1275	0	1	2.5	1.5	1.5	2		1.5	2	1.5	4	6.5
Autograft_1276	1	2	3	1.5	2	2.5	1	2	2	3.5	6	7.5
Autograft_12126		2	2.5	1.5	2	2.5		2	2	1.5	6	7
Autograft_12127	2	2	3		2	2	2	2	2	4	6	7
Autograft_12128		2.5	2.5			1.5		2	2	0	4.5	6

Tab. A.2: Genaue Daten der Histomorphometrie

	Total	Originärer Knochen	Neuer Knochen	Bindegewebe	Hintergrund (HG)	Total- HG	Orig. Knochen%	Neuer Knochen%	Binde- gewebe%
Empty_12117	27307000	2610500	1203500	10914000	12542000	14765000	17.68032509	8.151032848	73.91804944
Empty_12119	29098000	2502800	659600	10927000	14937000	14161000	17.67389309	4.657863145	77.16262976
Empty_12124	27982000	2629000	3254300	12721000	9230000	18752000	14.01983788	17.35441553	67.83809727
Empty_12125	27412000	3115800	1912800	13414000	8843100	18568900	16.77966923	10.30109484	72.2390664
Empty_12137	29012000	1054000	2768500	10847000	14156000	14856000	7.094776521	18.63556812	73.01427033
Fibrin_12150	27283000	1517500	4253700	10547000	10961000	16322000	9.297267492	26.06114447	64.61830658
Fibrin_12151	30647000	1729700	2055300	12098000	14705000	15942000	10.84995609	12.8923598	75.88759252
Fibrin_12152	30555000	820140	2564100	11460000	15705000	14850000	5.522828283	17.26666667	77.17171717
Fibrin_12153	29027000	1008500	1478300	12252000	14273000	14754000	6.835434458	10.01965569	83.04188695
Fibrin_12154	29608000	4411600	2369600	7134600	15680000	13928000	31.6743251	17.0132108	51.22487076
Fibrin_12155	29421000	621820	2663300	9190400	16902000	12519000	4.967010145	21.27406342	73.41161435
PTH _{low} _12122	28927000	2108100	1392500	14499000	10821000	18106000	11.64310173	7.690820722	80.07842704
PTH _{low} _12123	24475000	2200500	1164900	9035200	11997000	12478000	17.63503767	9.33563071	72.40903991
PTH _{low} _12133	28471000	2298100	2205300	13748000	9982600	18488400	12.42995608	11.92801973	74.36013933
PTH _{low} _12134	29157000	789370	4468700	11114000	12446000	16711000	4.723655077	26.74106876	66.50709114
PTH _{low} _12135	26614000	1476900	4805200	10006000	10216000	16398000	9.006586169	29.30357361	61.01963654
PTH _{low} _12136	27795000	1532000	1620300	11929000	12589000	15206000	10.07497041	10.65566224	78.44929633
PTH _{high} _12120	29421000	621820	2663300	9190400	16902000	12519000	4.967010145	21.27406342	73.41161435
PTH _{high} _12121	29110000	2008400	2133200	10254000	14367000	14743000	13.62273621	14.46923964	69.55165163
PTH _{high} _12129	29585000	1648300	5362100	8191400	14123000	15462000	10.66032855	34.67921356	52.97762256
PTH _{high} _12130	28237000	1741200	8127100	8309100	9704000	18533000	9.395133006	43.8520477	44.83407975
PTH _{high} _12131	30264000	1195200	1725500	12497000	14716000	15548000	7.687162336	11.0978904	80.37689735
PTH _{high} _12132	28494000	1644900	4509800	10941000	11106000	17388000	9.459972395	25.93627789	62.92270531

	Total	Originärer Knochen	Neuer Knochen	Binde gewebe	Hintergr und (HG)	Total-HG	Orig. Knochen%	Neuer Knochen%	Binde gewebe%
Autograft_1275	60557000	6837400	17991000	9796200	25472000	35085000	19.48810033	51.27832407	27.9213339
Autograft_1276	67183000	8143200	20390000	13116000	25487000	41696000	19.52993093	48.90157329	31.4562548
Autograft_12126	28624000	2143200	9153800	5236900	11994000	16630000	12.88755262	55.04389657	31.49067949
Autograft_12127	29837000	2553800	7794900	7688900	11500000	18337000	13.92703278	42.50913454	41.93106833
Autograft_12128	27938000	1097200	9775900	8499000	8493000	19445000	5.642581641	50.27462073	43.70789406

Tab. A.3a: Genaue Daten der Histologie (Leukozyten, Fremdkörperriesenzellen, Makrophagen)

	LEUKOZYTEN								FREMDKÖRPERRIESENZELLE								MAKROPHAGEN							
	CI	CH	TI	TH	DI	DII	DIII	Tot	CI	CH	TI	TH	DI	DII	DIII	Tot	CI	CH	TI	TH	DI	DII	DIII	Tot
Empty_12117	1	1	1	0	1	1	1	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	3
Empty_12119	0	0	1	0	1	1	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	3
Empty_12124	1	1	0	1	1	1	1	6	0	0	0	0	0	2	0	2	1	1	0	1	1	1	1	6
Empty_12125	0	1	0	0	1	1	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	7
Empty_12137	0	1	1	0	1	1	1	5	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	4
Fibrin_12150	1	1	0	1	1	1	1	6	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	7
Fibrin_12151	1	1	1	1	1	3	3	11	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	3	3	8
Fibrin_12152	1	0	1	1	1	1	1	6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	4
Fibrin_12153	1	0	2	2	3	3	1	12	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	2	2	0	7
Fibrin_12154	1	1	1	1	1	1	1	7	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	3	1	7
Fibrin_12155	1	1	1	1	2	2	1	9	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	5
PTH_low_12122	2	3	1	1	1	1	3	12	1	1	0	1	1	0	0	4	1	2	1	1	1	1	1	8
PTH_low_12123	1	1	1	1	3	3	2	12	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	2	1	8
PTH_low_12133	0	1	1	1	1	1	1	6	0	1	1	0	1	1	0	4	1	1	1	1	1	1	1	7
PTH_low_12134	1	1	1	1	1	1	2	8	1	0	0	1	0	0	1	3	0	0	1	1	1	1	1	5
PTH_low_12135	1	1	1	0	2	2	1	8	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	1	0	7
PTH_low_12136	0	1	1	0	0	1	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	4
PTH_high_12120	1	1	1	1	1	1	1	7	1	0	0	1	2	1	2	7	1	1	1	1	2	1	2	9
PTH_high_12121	1	1	1	0	1	1	1	6	0	0	0	0	1	0	1	2	1	1	1	0	1	1	1	6
PTH_high_12129	1	1	0	1	1	3	2	9	0	0	1	1	0	0	0	2	1	1	1	1	1	1	1	7
PTH_high_12130	0	1	1	1	1	0	1	5	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	2	1	0	0	4
PTH_high_12131	1	0	1	1	1	1	1	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	6
PTH_high_12132	1	1	1	0	1	1	2	7	0	0	0	0	1	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	7
Autograft_1275	0	1	1	0	0	1	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	4
Autograft_1276	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
Autograft_12126	0	0	1	0	1	1	1	4	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	4
Autograft_12127	1	1	1	0	1	1	1	6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	6
Autograft_12128	1	1	1	1	1	1	0	6	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	4

Tab. A.3b: Genaue Daten der Histologie (Fibrozyten, Osteoklasten, Enchondrale Ossifikation)

	FIBROZYTEN								OSTEOKLASTEN								ENCHONDRALE OSSIFIKATION							
	CI	CH	TI	TH	DI	DII	DIII	Tot	CI	CH	TI	TH	DI	DII	DIII	Tot	CI	CH	TI	TH	DI	DII	DIII	Tot
Empty_12117	0	1	3	3	3	3	3	16	2	1	2	0	0	0	0	5	1	0	0	1	0	0	0	2
Empty_12119	3	1	2	3	3	3	1	16	2	1	2	1	0	2	1	9	0	0	0	0	0	0	0	0
Empty_12124	0	0	1	1	1	0	0	3	1	2	3	1	0	0	1	8	0	1	0	0	0	1	1	3
Empty_12125	0	0	1	0	3	1	1	6	1	0	0	1	0	1	1	4	1	0	0	0	1	0	0	2
Empty_12137	0	3	3	0	3	3	3	15	0	1	2	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Fibrin_12150	0	0	3	1	3	3	0	10	2	2	2	1	0	0	3	10	0	0	0	0	0	0	0	0
Fibrin_12151	0	1	3	0	3	1	1	9	1	0	1	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Fibrin_12152	0	0	1	1	3	3	0	8	1	0	1	0	0	1	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Fibrin_12153	0	2	1	3	3	2	0	11	2	2	1	0	0	0	1	6	0	0	0	0	0	0	0	0
Fibrin_12154	0	0	2	1	3	3	0	9	2	1	1	1	0	0	2	7	0	1	0	1	0	0	1	3
Fibrin_12155	0	1	3	1	3	3	3	14	1	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
PTH _{low} _12122	2	1	1	1	0	0	1	6	1	1	2	3	0	0	0	7	0	0	1	0	0	0	0	1
PTH _{low} _12123	0	0	0	2	2	1	2	7	1	3	1	2	0	0	0	7	1	1	1	0	0	0	0	3
PTH _{low} _12133	0	0	3	2	3	1	1	10	3	2	1	1	0	0	3	10	0	0	0	0	0	0	0	0
PTH _{low} _12134	0	0	2	1	0	0	1	4	1	1	3	0	0	0	1	6	0	1	0	0	1	0	0	2
PTH _{low} _12135	2	2	1	0	3	3	3	14	3	2	2	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0
PTH ₀₃₃ _12136	0	0	1	0	3	3	1	8	3	1	2	2	0	0	0	8	1	1	0	0	0	0	1	3
PTH _{high} _12120	0	0	2	1	1	1	1	6	2	1	1	2	0	0	0	6	1	0	0	0	0	0	0	1
PTH _{high} _12121	1	0	3	2	2	1	2	11	1	1	3	1	0	0	2	8	0	0	0	0	0	0	0	0
PTH _{high} _12129	2	1	0	0	2	1	1	7	3	0	1	2	1	0	0	7	0	0	0	1	1	0	0	2
PTH _{high} _12130	0	0	2	2	1	0	0	5	2	0	3	0	2	2	0	9	0	0	0	0	0	1	1	2
PTH _{high} _12131	0	2	3	3	3	3	3	17	1	1	2	1	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
PTH _{high} _12132	0	0	1	0	0	1	0	2	2	2	1	1	2	1	2	11	0	0	0	0	1	1	1	3
Autograft_1275	0	0	0	0	1	2	1	4	1	1	0	1	0	0	0	3	0	0	1	1	1	1	0	4
Autograft_1276	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2	0	0	1	1	1	0	1	4
Autograft_12126	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	4	0	0	0	1	1	1	1	4
Autograft_12127	0	0	0	1	2	0	0	3	2	2	0	2	1	1	2	10	0	0	0	1	0	1	1	3
Autograft_12128	0	0	0	0	1	0	0	1	2	0	0	1	0	0	0	3	0	0	1	0	1	0	1	3

Tab.A.4: Ergebnisse der Radiologie; Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (SA) in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt

Knochenersatz	4 Wochen			8 Wochen			12 Wochen			Total		
	MW	SA	N	MW	SA	N	MW	SA	N	MW	SA	N
Empty	0.10	0.31	20	0.84	1.19	19	1.55	1.40	19	0.82	1.21	58
Fibrin	0.00	0.00	24	1.04	1.01	24	1.83	1.89	24	0.96	1.44	72
PTH _{low}	0.17	0.38	24	1.09	1.03	23	1.13	1.32	23	0.79	1.07	70
PTH _{high}	0.00	0.00	24	1.17	1.42	24	1.50	1.87	24	0.89	1.49	72
Autograft	1.62	1.14	13	2.79	1.64	19	3.18	2.23	20	2.64	1.87	52

Tab. A.5: Ergebnisse der Histomorphometrie; Mittelwerte (MW) der von der jeweiligen Phase eingenommenen Flächen in mm²; Standardabweichung (SA)

Knochenersatz	alter Knochen		Neugebildeter Knochen		Fibröses Gewebe	
	MW	SA	MW	SA	MW	SA
Empty	14.65	4.48	11.82	6.00	72.83	3.36
Fibrin	11.52	10.12	17.42	5.74	70.89	11.35
PTH _{low}	10.92	4.26	15.94	9.50	72.14	7.26
PTH _{high}	9.30	2.90	25.22	12.39	64.01	13.25
Autograft	14.30	5.73	49.60	4.57	35.30	7.04

Tab. A.6: Ergebnisse der Histologie; Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (SA)

Knochenersatz	Leukozyten		Makrophagen		FKRZ		Osteoklasten		Fibrozyten		Ench-Ossi	
	MW	SA	MW	SA	MW	SA	MW	SA	MW	SA	MW	SA
Empty	5.00	1.00	4.60	1.82	0.60	0.89	5.80	3.20	11.20	6.22	1.40	1.34
Fibrin	8.50	2.59	6.33	1.51	0.83	0.41	5.33	4.70	10.17	2.14	0.50	1.23
PTH _{low}	8.33	3.20	6.50	1.64	2.17	1.72	7.50	2.50	8.17	3.49	1.50	1.38
PTH _{high}	6.67	1.37	6.50	1.64	2.33	2.42	7.50	2.50	8.00	5.29	1.33	1.21
Autograft	4.20	2.05	4.00	1.41	0.40	0.55	4.4	5.4	1.80	1.64	3.60	0.55
Durchschnitt	6.68	2.70	5.68	1.83	1.32	1.59	6.11	3,05	7.96	4.95	1.61	1.50

8.2 Abbildungen

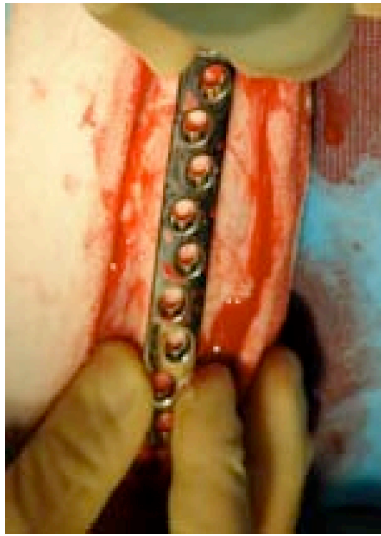


Abb.3.1



Abb.3.2



Abb.3.3



Abb.3.4

Abb. 3.1: Mittels Plattenbieger wird die LC-DCP der Diaphyse der Tibia nachgeformt und danach an den Knochen gebohrt.

Abb. 3.2: Nach dem Abschrauben der LC-DCP werden zwei parallele Osteotomien mit der oszillierenden Säge durchgeführt.

Abb. 3.3: Das Segment wird entfernt.

Abb. 3.4: Daraufhin wird die Platte wieder angeschraubt und das Hydrogel in den Defektspace eingebracht.

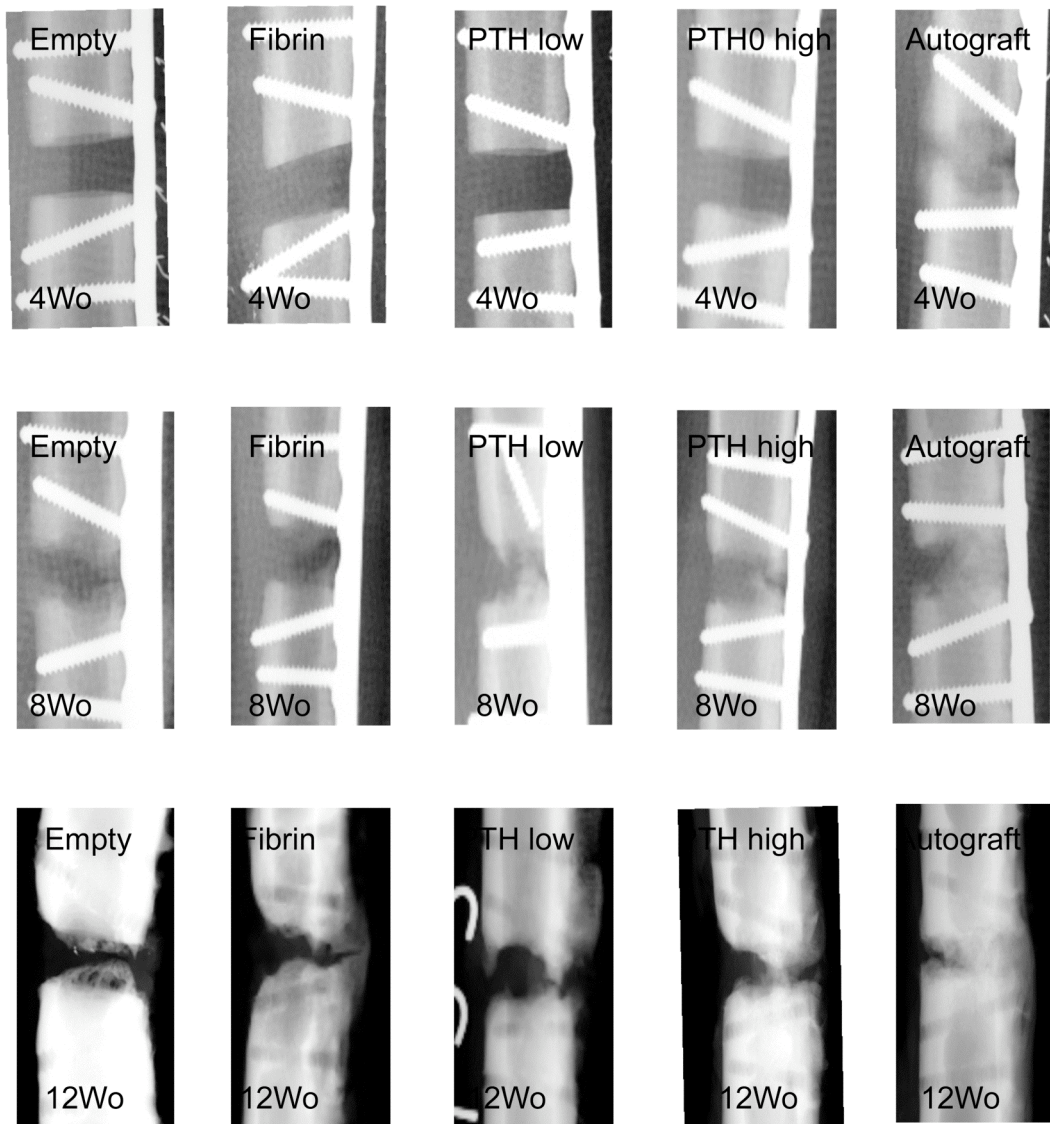


Abb. 4.1: Röntgenbilder

	Empty	Fibrin	PTH_{low}	PTH_{high}	Autograft
4 Wochen	12124	12152	12133	12129	12127
8 Wochen	12125	12153	12134	12132	12128
12 Wochen	12119	12155	12133	12129	12127

Ausschnittsvergrößerungen der Tibiadeфекte nach 4, 8 und 12 Wochen post operationem.

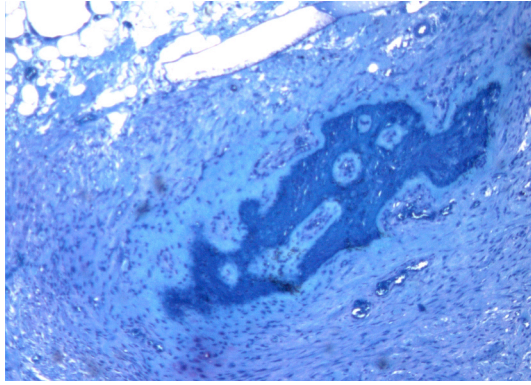


Abb.4.2

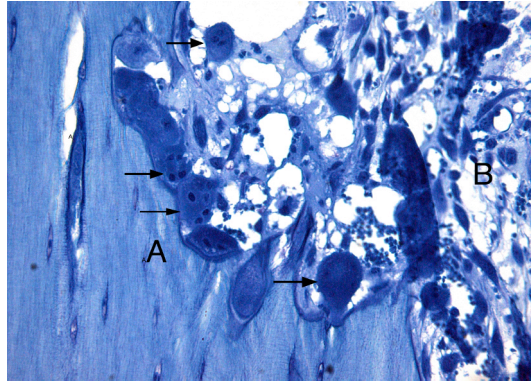


Abb.4.3

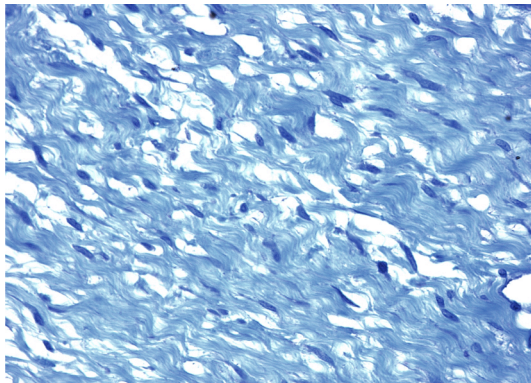


Abb.4.4

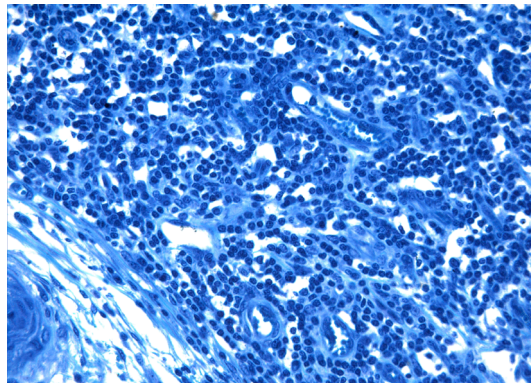


Abb.4.5

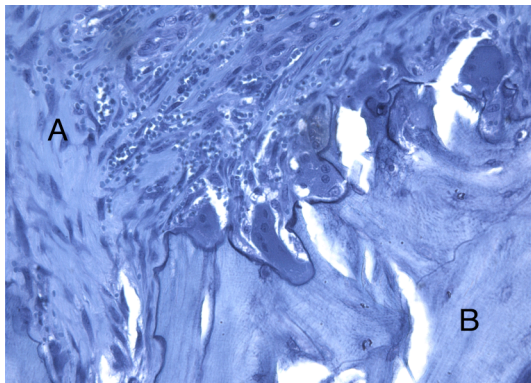


Abb.4.6

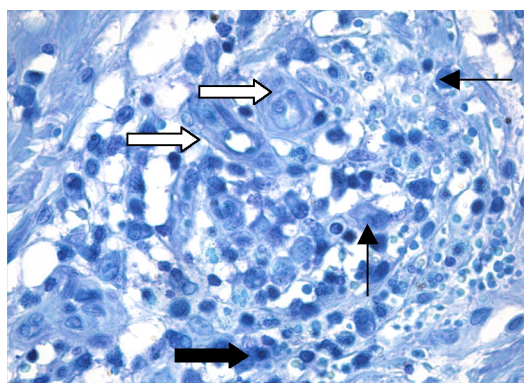


Abb.4.7

Abb. 4.2: Geflechtknocheninsel, eingebettet in Bindegewebe und Osteoblasten. Dieser Ausnahmefall zeigt neu gebildeten Knochen im Defekt.

Empty_12124, Defekt II, 10fache Vergr., Färbung: Toluidinblau

Abb.4.3: Osteoklasten an der Cisseite des originären Knochens (A). Im Defekt (B) sind Adipozyten sichtbar. (Knochenmark) Empty_12124, Cisseite II, 20fache Vergr., Färbung: Toluidinblau

Abb.4.4: Kollagenfaserreiches Bindegewebe durch Fibrozyten gebildet.

Empty_12137, Defekt I, 20fache Vergr., Färbung: Toluidinblau

Abb.4.5: Plasmazellen und Leukozyten im Defekt

Fibrin_12137, Defekt II, 20fache Vergr., Färbung: Toluidinblau

Abb.4.6: Osteoklasten zeigen sich an Defekt- (A) und originärer (B) Knochengrenze.

PTH_{low}_12123, Cisseite I, 20fache Vergr., Färbung: Toluidinblau

Abb.4.7: Lymphozyten(→), Plasmazellen(←), Makrophagen(↑) und einsproßende Gefäße(⇒) im Defektsplatt.. PTH_{low}_12123, Defekt II, 20fache Vergr., Färbung: Toluidinblau

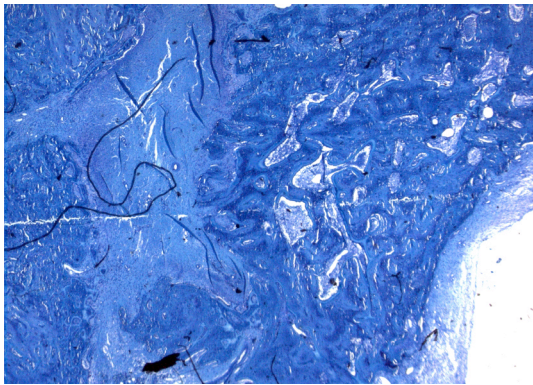


Abb.4.8

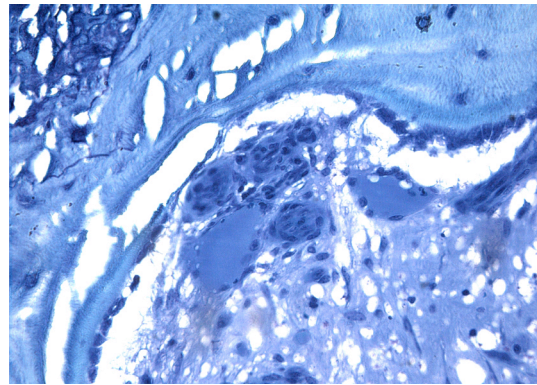


Abb.4.9

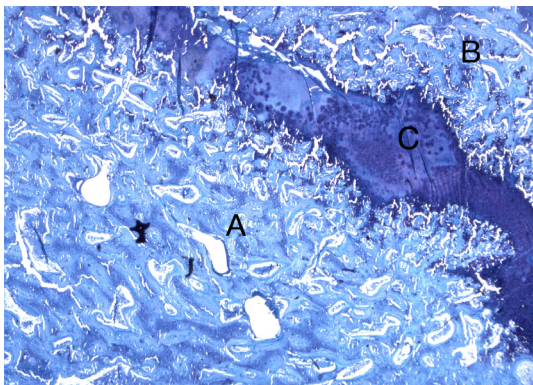


Abb.4.10

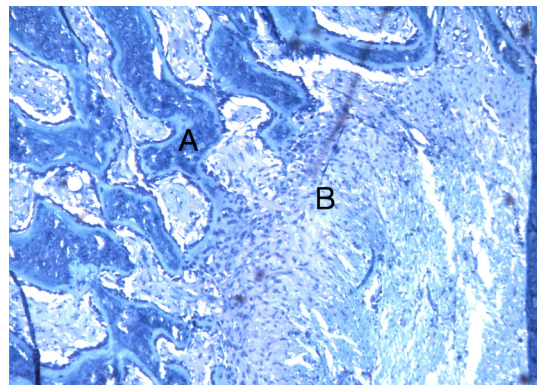


Abb.4.11

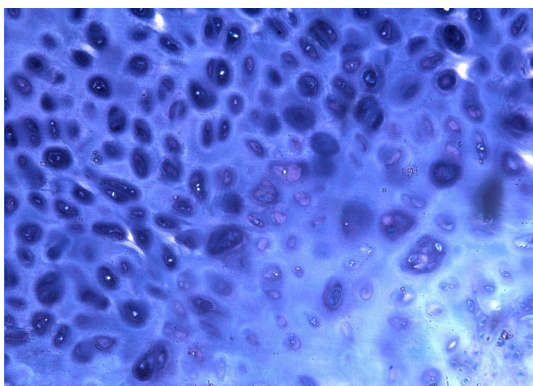


Abb.4.12

Abb.4.8: Knochenneubildung. Die hohe Aktivität der Osteoblasten führt zur Überbrückung des Defekts auf der Cisseite.

PTH_{high}_12120, Cisseite II, 1,25fache Vergr., Färbung: Toluidinblau

Abb.4.9: Fremdkörperriesenzellen an Defekt- und originärer Knochengrenze. An der originären Knochengrenze ist ein Layer an Osteoblasten zu sehen.

PTH_{high}_12129, Transseite II, 20fache Vergr., Färbung: Toluidinblau

Abb.4.10: Die hohe Aktivität der Osteoblasten führt zur Knochenneubildung von proximal (A) nach distal (B) in den Defekt hinein. Zur Überbrückung des Defektes kommt es durch enchondrale Ossifikation (C).

PTH_{high}_12130, Defekt II, 1,25fache Vergr., Färbung: Toluidinblau

Abb.4.11: Resorptions-Defektgrenze. Die hohe Aktivität der Knochenneubildung wird durch die noch nicht mineralisierten Osteoidsäume deutlich.

PTH_{high}_12130, Cisseite II, 10fache Vergr., Färbung: Toluidinblau

Abb.4.12: Enchondrale Ossifikation auf Transseite.

Autograft_12127, Transseite, 20fache Vergr., Färbung: Toluidinblau

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an **Prof. Dr. Brigitte von Rechenberg**, Leiterin der Musculoskeletal Research Unit (MSRU), für die Überlassung des Themas sowie die hervorragende und von großem fachlichem und persönlichem Einsatz geprägte Betreuung der Arbeit.

Herrn **Prof. Dr. Jörg Auer**, Direktor der Pferdeklinik der Universität Zürich, möchte ich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung der MSRU danken.

Herrn **Prof. Dr. Mark Flückiger**, danke ich für die Übernahme des Korreferates und für die große Hilfe bei der Auswertung der Röntgenbilder.

Dr. Silke Mark der Firma Kuros Biosurgery AG danke ich für die Unterstützung und die sehr gute Zusammenarbeit in diesem Projekt.

Vielen Dank auch an **Kati Zinsky** und **Sabina Wunderlin** für die hervorragende Arbeit bei der Herstellung der histologischen Präparate.

Immens gedankt sei **Dr. Karina Klein**, MSRU, für ihre große Hilfe bei der ganzen Organisation meines Lebens und für ihren Humor - you are a star.

Ebenso geht mein Dank an **Dr. Jens Langhoff** und **Rainer Egle** für die geduldige Unterstützung bei computertechnischen Fragen und Problemen.

Ein großes Dankeschön an meine Mitstreiter aus der MSRU: **Tanja, Corinne, Karinsche, Jenseblümschn, Niels, Inga, Oliver, Katja, Sabine, Käthie, Alex, Kathrin, Mausi, Birthe, Inga** und **Kiki** für das gute Arbeitsklima am Strickhof, den freundschaftlichen Zusammenhalt und die unzähligen Feste.

Mein ganz besonders herzlicher Dank geht an meine Eltern **Renata Leander-Streifeneder** und **Dr. Fritz Streifeneder** für ihre Unterstützung auf meinem Lebensweg.

Ein riesiger Dank geht an **Dr. Philipp Lurz**, für die Hilfe in allen Lebenslagen und bei der wissenschaftlichen Arbeit.

Aus tiefstem Herzen sei **Georg Osterhoff** für das Korrekturlesen der Arbeit, für das Märchenvorlesen, das Lesen zwischen den Zeilen und in meinen Augen gedankt, um Vergebung gebeten und auf eine Freundschaft gehofft.

.

Lebenslauf

Name	Dinah Esther Streifeneder
Geburtsdatum	12.09.1980
Geburtsort	Gräfelfing bei München, Deutschland
Nationalität	Deutsch

1987 – 1990	Deutsche Schule Rom, Italien
1990 – 1995	Gymnasium Gröbenzell, Deutschland
1995 – 1996	Deutsche Schule Marbella, Spanien
1996 – 1997	Erasmus Grasser Gymnasium, Deutschland
1997 – 2000	LSH Schloss Ising, Deutschland
2000	Abschluss Allgemeine Hochschulreife

Studium der Veterinärmedizin:

2000 – 2002	Szent Istvan Universität, Budapest, Ungarn
2002 – 2004	Veterinärmedizinische Fakultät Leipzig, Deutschland
2004 – 2005	Vetsuisse Fakultät Zürich, Schweiz
2005 – 2006	Veterinärmedizinische Fakultät Leipzig, Deutschland
Mai 2006	Approbation zur Tierärztin

Anfertigung der Dissertation:

2006 - 2007	Musculoskeletal Research Unit (MSRU), Tierspital Zürich, unter Leitung von Prof.Dr.med.vet. Brigitte von Rechenberg
-------------	--

Praktische Arbeit als Tierärztin:

2007 - 2007	Fitzpatrick Referrals, Tilford, England
2007 - 2008	Rig Vets Recruitment, London, England